



Le récepteur P2X7 : évaluation de cette cible thérapeutique dans les pathologies inflammatoires et dans le cancer

Melanie Demeules

► To cite this version:

Melanie Demeules. Le récepteur P2X7 : évaluation de cette cible thérapeutique dans les pathologies inflammatoires et dans le cancer. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR020 . tel-03824361

HAL Id: tel-03824361

<https://theses.hal.science/tel-03824361>

Submitted on 21 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Le récepteur P2X7 : évaluation de cette cible thérapeutique dans les pathologies inflammatoires et dans le cancer

**Présentée et soutenue par
MELANIE DEMEULES**

**Thèse soutenue le 31/05/2022
devant le jury composé de**

M. SEBASTIEN ROGER	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
MME VALERIE VOURET-CRAVIARI	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS	Rapporteur du jury
M. KARIM BENIHOUD	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris-Saclay	Membre du jury
MME CECILE DELARASSE	CHARGE DE RECHERCHE, SORBONNE UNIVERSITE	Membre du jury
MME ISABELLE DUBUS	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Président du jury
M. SAHIL ADRIOUCH	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par SAHIL ADRIOUCH (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE)



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Le récepteur P2X7 : évaluation de cette cible thérapeutique dans les pathologies inflammatoires et dans le cancer

**Présentée et soutenue par
MELANIE DEMEULES**

**Thèse soutenue le 31/05/2022
devant le jury composé de**

M. SEBASTIEN ROGER	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
MME VALERIE VOURET-CRAVIARI	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS	Rapporteur du jury
M. KARIM BENIHOUD	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris-Saclay	Membre du jury
MME CECILE DELARASSE	CHARGE DE RECHERCHE, SORBONNE UNIVERSITE	Membre du jury
MME ISABELLE DUBUS	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. SAHIL ADRIOUCH	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par SAHIL ADRIOUCH (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE),



Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord Sébastien Roger, Valérie Vouret-Craviari, Karim Benihoud, Cécile Delarasse et Isabelle Dubus d'avoir pris part à ce jury.

Je remercie le Pr. Olivier Boyer de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je souhaite remercier Sahil sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Merci de ton soutien professionnel et personnel, et de ton accompagnement qui m'a permis d'évoluer tout au long de ces quatre années.

Merci à tous ceux qui ont participé à la relecture de cette thèse, Romain, Allan et Marine. Merci au bureau des « Sahiliens », Romain, Henri, Allan et Marine pour tous ces bons moments partagés. Allan merci d'avoir fait partie de ce projet de thèse durant ton master, nos disputes de vieux couple de labo me manqueront. Romain merci pour ces bons moments passés à parler livres et science entre autres, ton humour me manquera. Henri merci pour ces moments passés au labo, ton « c'est l'enfer ! » restera. Et Marine merci d'avoir féminisé ce bureau et tous ces bons moments avec toi. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Gaëtan pour m'avoir appris autant de choses en cytométrie.

Merci à Marie et Justine pour ces moments passés au labo et nos soirées entre filles. Une pensée pour le bureau des toupoutous, Baptiste, Charlotte, Marie et Sarah pour ces bons moments trop courts.

Je souhaite également remercier mes parents, ainsi que Aurélie et Océane, d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments.

Table des matières

I- La signalisation purinergique et le récepteur P2X7	9
1- La signalisation purinergique en général et le récepteur P2X7 en particulier	9
1.1. Les récepteurs purinergiques	9
1.1.1. Les récepteurs P1 à l'adénosine	10
1.1.2. Les récepteurs métabotropiques P2Y associés aux protéines G.....	11
1.1.3. Les récepteurs ionotropiques P2X.....	13
1.2. Structure et expression du récepteur P2X7	17
1.2.1. Distribution tissulaire et cellulaire	17
1.2.2. Structure de P2X7.....	18
1.3. Variants de P2X7	21
1.4. Polymorphisme de P2X7	25
1.4.1. Polymorphisme humain	25
1.4.2. Polymorphismes murins.....	26
1.5 . Formation du macropore	27
2. Fonctions du récepteur P2X7	29
2.1. Stimulation de l'inflammasome et sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18.....	30
2.2. Libération d'espèces réactives de l'oxygène et activation de la voie NF- κ B.....	30
2.3. Organisation et perméabilité membranaire	31
2.4. Stimulation des métalloprotéases.....	32
2.5. Stimulation de la phospholipase D et A2	33
2.6. Activation et Prolifération	33
2.7. Mort cellulaire	35
3. Sources et devenir des molécules capables d'activer P2X7	36
3.1. L'ATP	36
3.2. Le NAD ⁺	37
3.3. Régulation de la concentration d'ATP extracellulaire : les ectonucléosidases	38
3.4. Dégradation du NAD ⁺ extracellulaire	40
4. Le récepteur P2X7, la signalisation purinergique et le système immunitaire.....	42
4.1. P2X7 et système immunitaire innée	42
4.1.1. L'inflammasome NLRP3.....	42
4.1.2. Le récepteur P2X7 sur les cellules dendritiques.....	45
4.2. P2X7 et système immunitaire adaptatif.....	47
4.2.1. Rôle de P2X7 dans l'activation des LT	47
4.2.2. Sensibilité différentielle des LT à la mort cellulaire induite par l'ATP et le NAD ⁺	48

4.2.3.	Rôle de P2X7 dans la réponse des lymphocytes T naïfs	49
4.2.4.	Activité du récepteur P2X7 dans la fonction des LT effecteurs et mémoires	50
4.2.5.	Fonction du récepteur P2X7 sur les LT CD8 ⁺	51
4.2.6.	P2X7 et lymphocytes T régulateurs	51
II-	Rôle du récepteur P2X7 dans l'inflammation et le cancer	53
1.	Le récepteur P2X7 dans les maladies inflammatoires.....	53
1.1.	P2X7 dans les maladies neurodégénératives et psychiatriques	53
1.2.	La signalisation purinergique dans l'inflammation	54
2.	Le récepteur P2X7 dans le cancer	56
2.1.	Généralités	56
2.2.	Rôle de la signalisation purinergique dans le microenvironnement tumoral.....	57
2.3.	Rôle de la signalisation purinergique dans les réponses immunitaires antitumorales.....	66
III-	Les voies de manipulations pharmacologiques et biologiques de la signalisation purinergique	72
1.	La signalisation purinergique et les points de contrôle immunitaires	72
1.1.	Les points de contrôle immunitaires classiques.....	72
1.2.	CD39 et CD73 comme nouveaux points de contrôle immunitaires.....	77
1.2.1.	CD39 et CD73 dans le TME	77
1.2.2.	CD39 dans l'immunité antitumorale	77
1.2.3.	CD39 dans les cancers humains	78
1.2.4.	CD73 dans l'immunité antitumorale	78
1.2.5.	CD73 dans les cancers humains	79
1.2.6.	Cibler CD39 et CD73 en tant que points de contrôle immunitaires.....	79
2.	Les souris déficientes pour P2X7 et les molécules pharmacologiques ciblant P2X7	82
2.1.	Souris génétiquement modifiées pour P2X7.....	82
2.3.	Agonistes de P2X7	84
2.4.	Modulateurs allostériques	85
2.5.	La signalisation purinergique comme cible thérapeutique.....	86
3.	Les inhibiteurs biologiques : anticorps et nanobodies.....	87
4.	La méthodologie AAV-nanobodies.....	90
4.1.	Les AAV.....	90
4.1.1.	Généralités	90
4.1.2.	Les AAV comme vecteur pour l'administration de gènes <i>in vivo</i>	91
4.1.3.	Les sérotypes	94
4.2.	La méthodologie AAVnano.....	96

Objectifs de la thèse.....	99
Résultats	100
Discussion	269
Bibliographie	282
Annexes.....	314

Liste des tables

Table 1 : Expression et mécanisme de couplage des récepteurs P1 à l'adénosine

Table 2 : Description des récepteurs P2Y

Table 3 : Description des récepteurs P2X

Table 4 : Haplotypes présent dans 99% de la population caucasienne

Table 5 : Récepteurs purinergiques et cibles thérapeutiques

Table 6 : Anticorps monoclonaux et nanobodies modulant la fonction de P2X7

Table 7 : Tropisme des différents sérotypes des AAV

Liste des figures

Figure 1 : La signalisation purinergique

Figure 2 : Structure des récepteurs P2Y

Figure 3 : Structure des récepteurs P2X

Figure 4 : Rôles des récepteurs P2

Figure 5 : Cristallographie du récepteur P2X7

Figure 6 : Variants du récepteur P2X7 chez l'humain et la souris

Figure 7 : Analyse haploview du déséquilibre de liaison dans le gène P2RX7

Figure 8 : Principales fonctions de P2X7 dans les LT : Modulation du phénotype des LT, de la réponse à la stimulation mitogénique et régulation de la survie

Figure 9 : Structure et site de catalyse des enzymes de l'ATP et du NAD⁺

Figure 10 : Devenir de l'ATP et du NAD extracellulaires et signalisation purinergique induite par ces molécules et catabolites

Figure 11 : Modèle à deux signaux de l'inflammasome

Figure 12 : Homéostasie de l'ATP dans le microenvironnement tumoral

Figure 13 : Stimulation du métabolisme par l'ATP agissant via P2X7

Figure 14 : Influence de l'activité de P2X7 sur les cellules tumorales et le système immunitaire

Figure 15 : Immunostimulation par l'ATP extracellulaire

Figure 16 : Effet des anticorps anti-point de contrôle immunitaire

Figure 17 : Structure chimique des principaux antagonistes du récepteur P2X7

Figure 18 : Structure chimique des modulateurs allostériques de P2X7

Figure 19 : Comparaison entre les anticorps conventionnels et les nanobodies

Figure 20 : Mécanismes impliqués dans la transduction lors de l'utilisation des vecteurs rAAV.

Figure 21 : Format des nanobodies utilisés dans cette étude.

Figure 22 : Méthodologie AAVnano

Liste des abréviations

AAV : virus adéno-associés
ADA : adénosine désaminase
ADAM : protéines contenant un domaine de distintégrine et de métalloprotéase (*a distintegrin and metalloprotease domain-containing proteins*)
ADP : adénosine 5-diphosphate
ADPRc : ADP ribose cyclique
AMP : adénosine monophosphate
ANO6 : anoctamine 6
ART : ADP-Ribosyl transferase
Atg5 : autophagy-related 5
ATP : adénosine-5'-triphosphate
ATPe : ATP extracellulaire
BBG : Bleu Brillant G (*Brillant Blue G*)
bzATP : 2'(3')-2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DAMPs : motif moléculaire associé aux dommages (*damage-associated molecular pattern*)
DC : cellules dendritiques
EMMA : European Mutant Mouse Archive
E-NPPs : ecto-nucléotide pyrophosphatases / phosphodiesterases
Fab : fragment de liaison à l'antigène
Fc : fragments cristallisables
FoxP3 : forkhead box P3
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GSDMD : Gasdermine D
HMGB1 : protéine B1 du groupe à haute mobilité
ICD : mort immunogénique (*Immunogenic cell death*)
ICI : points de contrôle immunitaires (*Immune checkpoint inhibitor*)
IDO : indoleamine 2,3-deoxygénase
IFN- γ : Interféron- γ
IL : Interleukine
IP3 : phosphates inositols
ITR : répétitions terminales inversées
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
LPS : lipopolysaccharides
LT : lymphocytes T
MDSC : cellules suppressives dérivées de la myéloïde (*myeloid-derived suppressor cells*)
MMP : métalloprotéases matricielles
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NK : cellules natural killer
NLR : protéines contenant des répétitions riches en leucine (LRR) (*leucine-rich repeat (LRR)-containing proteins*)
NMDG : N-méthyl-D-glucamine
NOD : domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (*nucleotide-binding oligomerization domain*)
NOX : NADPH oxydase

PAMPs : motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*)
PARPs : poly-ADP-ribosylpolymérase
PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1
PFK : phosphofructokinase
PKM2 : isoforme M2 de la pyruvate kinase
pmeLUC : plasma membrane luciferase
PRR : récepteur de reconnaissance des motifs (*pattern recognition receptor*)
rAAV : AAV recombinants
ROS : espèces réactives de l'oxygène
TAM : macrophages associés à la tumeur
TCR : récepteur des cellules T
Tfh : LT folliculaires helper
TME : microenvironnement tumoral (*Tumor MicroEnvironment*)
Tregs : lymphocytes T régulateurs
T_{rm} : LT résidents mémoires
VCAM 1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1
UTP : uridine 5'-trisphosphate

I- La signalisation purinergique et le récepteur P2X7

Les nucléotides (ATP, ADP, UTP, UDP et UDP-glucose) sont des molécules ubiquitaires impliquées dans le contrôle de nombreux processus cellulaires, agissant comme coenzymes, intermédiaires énergétiques, modulateurs allostériques, aussi bien que messagers intracellulaires et intercellulaires. La première évidence que les nucléotides participent à la communication comme messagers intercellulaires a été établie dans le système nerveux périphérique par Geoffrey Burnstock, qui fut le premier à décrire la « signalisation purinergique » (Burnstock et al. 1970). Malgré un scepticisme initial largement répandu, il est désormais clair que les nucléotides extracellulaires, notamment l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), sont des molécules de signalisation omniprésentes, principalement libérées lors de la neurotransmission, mais aussi en réponse à divers facteurs de stress cellulaire tels que la distorsion mécanique, le gonflement osmotique, l'hypoxie et les agents cytotoxiques. Ainsi les nucléotides peuvent être libérés à la suite d'une lésion cellulaire ou par des voies non lytiques telles que l'exocytose sécrétoire ou les canaux de la membrane plasmique (Forrester and Williams 1977). Une fois dans le compartiment extracellulaire, les nucléotides se lient et activent les récepteurs de la famille P2. Pratiquement toutes les cellules de mammifères expriment des récepteurs P2 avec une spécificité et une affinité différente, conférant ainsi au système purinergique une plasticité remarquable qui permet une régulation fine de nombreuses réponses physiopathologiques (Burnstock 2017). Parmi ces récepteurs P2, le récepteur P2X7 joue un rôle important dans de nombreux contextes physiopathologiques, notamment dans l'inflammation, les maladies auto-immunes et le cancer. Il semble donc être une piste thérapeutique potentielle. On le retrouve notamment surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines et murines mais il est aussi lié à l'inflammation et à l'immunité antitumorale. Son rôle reste cependant à éclaircir. Durant cette thèse nous nous sommes intéressés à la signalisation purinergique et plus particulièrement au récepteur P2X7 dans l'inflammation et le cancer.

1- La signalisation purinergique en général et le récepteur P2X7 en particulier

1.1. Les récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont des protéines membranaires dépendantes d'un ligand. Elles sont exprimées par la plupart des tissus et jouent un rôle dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques telles que les maladies inflammatoires, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Ces récepteurs sont activés par les nucléotides extracellulaires

ou par les nucléosides issus de leur dégradation. Ces récepteurs ont été définis pour la première fois en 1976 (Burnstock 1976) et ont été subdivisés deux ans plus tard en récepteurs P1 et P2 par Burnstock (Burnstock 1990). Puis une nouvelle classification sera proposée en 1985 dans laquelle les récepteurs P2 ont été subdivisés en P2Y et P2X (Burnstock and Kennedy 1985). (**Figure 1**)

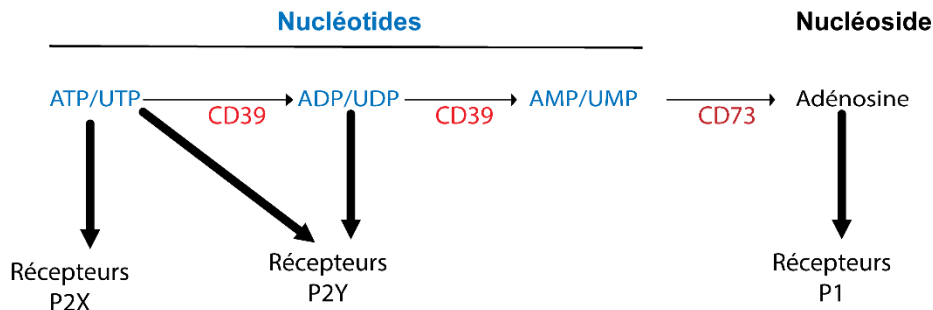


Figure 1 : La signalisation purinergique

Les nucléotides (ATP, UTP, ADP et UDP) se lient aux récepteurs P2 tandis que le nucléoside, l'adénosine se lie au récepteurs P1. L'ATP/UTP sont catalysés en ADP/UDP puis en AMP/UMP par l'ectoenzyme CD39. L'AMP et l'UMP sont catalysés en Adénosine par l'enzyme CD73.

1.1.1. Les récepteurs P1 à l'adénosine

Quatre sous-types de récepteurs P1 ont été clonés et caractérisés : les récepteurs A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃. Ce sont des récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G et activés par l'adénosine extracellulaire. Ils sont formés d'une partie transmembranaire composée de sept hélices de 20 à 27 acides aminés liés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Chez l'homme, les récepteurs à l'adénosine présentent une homologie de séquence de 39 à 61% dans les régions transmembranaires. Leur queue C-terminale présente une longueur variable allant de 30 à 40 acides aminés pour les récepteurs A₁, A_{2B} et A₃ jusqu'à 122 acides aminés pour le récepteur A_{2A}. Leur partie N-terminale est relativement courte, de sept à treize acides aminés. Ils sont caractérisés par une distribution tissulaire et un couplage différent aux protéines G (**Table 1**), ainsi que par une forte affinité (A₁, A_{2A}, A₃) ou faible affinité (A_{2B}) pour l'adénosine. Les récepteurs A₁ et A₃ sont préférentiellement couplés aux protéines Gi/o, inhibant l'adénylate cyclase et la production de l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique, tandis que les récepteurs A_{2A} et A_{2B} sont généralement couplés aux protéines Gs et déclenchent une accumulation intracellulaire d'AMP cyclique. Ces récepteurs sont associés à différents effets physiologiques, en particulier à la modulation du système cardiovasculaire, du système immunitaire et du système nerveux. Ceci a été confirmé par des souris déficientes pour ces récepteurs (Sun et al. 2001; Ledent et al. 1997). Les récepteurs P1 sont exprimés dans les systèmes nerveux, cardiovasculaire, respiratoire, gastro-intestinal, urogénital et immunitaire et également dans le tissu osseux, les articulations, les yeux et la peau (**Table 1**).

Récepteur	Expression	Couplage	Messagers secondaires
A ₁	Système nerveux central, cœur, rein, tissus adipeux, pancréas, tissu épithélial des voies respiratoires, cellules musculaires lisses et cellules immunitaires (éosinophiles, macrophages, monocytes) (Poulsen and Quinn 1998)	Protéine G _i et G _o	Activation de la phospholipase C, augmentation des IP ₃ et du Ca ²⁺ intracellulaire qui va activer la PKC
A _{2A}	Niveau central et périphérique, forte expression dans le striatum, tubercule olfactif et système immunitaire, niveaux plus faibles dans le cortex cérébral, l'hippocampe, cœur, poumons, vaisseaux sanguins (Fredholm, Cunha, and Svenningsson 2003)	Protéine G _s	Augmentation de l'AMPc, activation de la PKA
A _{2B}	Largement exprimé, surtout en périphérie, intestin, vessie, poumons, canaux déférents, fibroblastes, muscles lisses, cellules endothéliales, immunitaires, épithéliales alvéolaires, cellules gustatives et les plaquettes, astrocytes, neurones et microglie (Cacciari et al. 2005)	Protéine G _s	Activation de l'adénylate cyclase, augmentation de l'AMPc, activation de la PKA
A ₃	Faiblement exprimé dans le cerveau, microglie, astrocytes, cœur, neurones entériques, cellules épithéliales, muqueuse colique, parenchyme pulmonaire et bronches, cellules inflammatoires (Poulsen and Quinn 1998)	Protéine G _i	Réduction d'AMPc, inhibition de la PKA

Table 1 : Expression et fonctions des récepteurs P1 à l'adénosine.

Expression, couplage et messagers secondaires des récepteurs P1 à l'adénosine. IP₃ : phosphatidylinositol, AMPc : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A. D'après (Borea et al. 2018)

1.1.2. Les récepteurs métabotropiques P2Y associés aux protéines G

Les récepteurs P2Y sont couplés aux protéines G et ont pour ligands des nucléotides extracellulaires. Le premier récepteur P2Y a été cloné en 1993 (Webb et al. 1993). Chez l'homme, 8 récepteurs P2Y ont été caractérisés : P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14. Ces récepteurs sont sensibles à divers nucléotides : P2Y1, P2Y12 et P2Y13 sont préférentiellement activés par l'adénosine 5-diphosphate (ADP) (**Table 2**) ; P2Y2 est aussi sensible à l'ATP et à l'uridine 5'-triphosphate (UTP) ; P2Y4 est préférentiellement activé par l'UTP, P2Y6 par l'uridine 5'-diphosphate (UDP) tandis que P2Y11 est le seul récepteur P2Y sélectif pour l'ATP (Communi et al. 2001). Les récepteurs P2Y ont une haute affinité pour leurs ligands. En effet, ils sont sensibles à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Ces récepteurs sont formés d'une région transmembranaire hydrophobe composée de sept feuilletts connectés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Ils possèdent tous dans leurs domaines extracellulaires quatre résidus cystéines qui

permettent de former deux ponts disulfures. Ils peuvent former des homodimères ou hétérodimères (**Figure 2**). D'un point de vue structural et phylogénique, deux sous-groupes de récepteurs P2Y ont été caractérisés sur la base de leur homologie de séquence (Abbracchio et al. 2006). Le premier sous-groupe comporte les récepteurs P2Y1, 2, 4, 6, 11. Ils sont couplés par l'intermédiaire des protéines Gq à la phospholipase C pour laquelle sa stimulation est suivie d'une augmentation des phosphates inositols (IP3) et de la mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires. Le récepteur P2Y11 est, de manière additionnelle, associé aux protéines Gs, ce qui entraîne une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase. Tandis que le second sous-groupe comprend les récepteurs P2Y12, 13 et 14 et est principalement associé aux protéines Gi et à l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase ou au contrôle de l'activité des canaux ioniques (Von Kügelgen and Hoffmann 2016).

Récepteur	Agoniste préférentiel	Protéines G associées	Signal de transduction	Second messenger intracellulaire	Expression
P2Y1	ATP et ADP	Gq	Activation de la PLC et production d'IP3	Augmentation du Ca^{2+}	Largement exprimé, en particulier sur les astrocytes, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, macrophages, ostéoblastes, lymphocytes et plaquettes
P2Y2	ATP et UTP	Gq	Activation de la PLC et production d'IP3	Augmentation du Ca^{2+}	Cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes, macrophages, ostéoblastes, neutrophiles et lymphocytes
P2Y4	UTP	Gq	Activation de la PLC et production d'IP3	Augmentation du Ca^{2+}	Cellules souches mésenchymateuses, cellules épithéliales, cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes et chondrocytes
P2Y6	UDP	Gq	Activation de la PLC et production d'IP3	Augmentation du Ca^{2+}	Cellules endothéliales, macrophages, ostéoclastes, lymphocytes, fibroblastes et cellules gliales
P2Y11	ATP	Gq et Gs	Activation de la PLC, production d'IP3 et stimulation de l'AC	Augmentation du Ca^{2+} et du AMPc	Cellules souches hématopoïétiques et cellules dendritiques
P2Y12	ADP	Gi	Inhibition de l'AC	Diminution du AMPc	Lymphocytes et plaquettes
P2Y13	ADP	Gi	Inhibition de l'AC	Diminution du AMPc	Monocytes
P2Y14	UDP-glucose et UDP-galactose	Gi	Inhibition de l'AC	Diminution du AMPc	Cellules souches hématopoïétiques, kératinocytes, neutrophiles, mastocytes, cellules épithéliales, lymphocytes et monocytes

Table 2 : Description des récepteurs P2Y

Agoniste préférentiel, mécanisme de couplage, signal de transduction, second messenger intracellulaire et expression cellulaires des récepteurs P2Y. PLC : phosphatase lipase C, IP3 : phosphates inositols, AC : adénylate cyclase ; AMPc : AMP cyclique (Burnstock and Knight 2004)

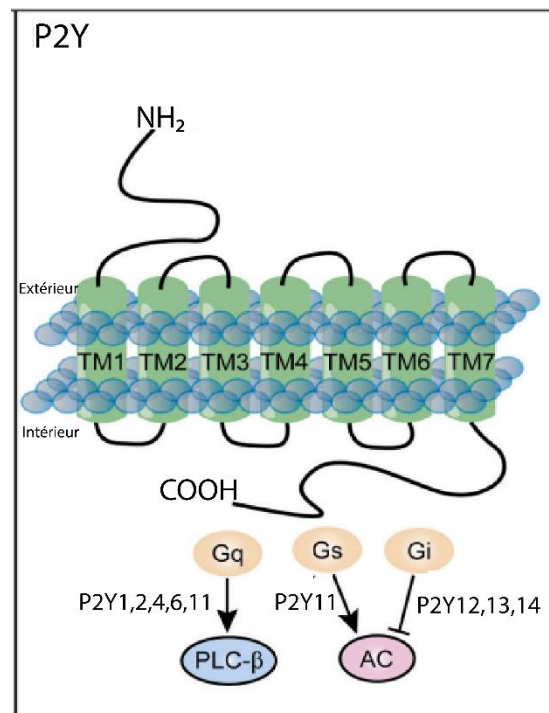


Figure 2 : Structure des récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont formés de sept feuillets transmembranaires notés TM1 à TM7, d'une queue N-terminale extracellulaire et d'une queue C-terminale intracellulaire couplée à des protéines G. PLC : phospholipase-C, AC : adénylate cyclase. D'après (Vultaggio-Poma et al. 2022).

1.1.3. Les récepteurs ionotropiques P2X

Les récepteurs P2X sont des canaux ioniques membranaires qui s'ouvrent en réponse à la fixation de l'ATP extracellulaire entraînant notamment l'influx rapide de Ca^{2+} , de Na^+ , et l'efflux de K^+ . (**Figure 3**) Ils sont présents sur la plupart des cellules excitables et non excitables (North 2002). La famille des récepteurs ionotropiques P2X comporte sept membres, de P2X1 à P2X7 (**Table 3**). Un récepteur P2RXn est composé de trois sous-unités protéiques P2Xn. En effet, d'après la nomenclature officielle une protéine P2Xn correspond à une sous unité codée par le gène *p2xrn* et l'association de ces 3 protéines correspond à un récepteur P2RXn. Dans la suite de ce manuscrit, nous parlerons des protéines P2Xn et des récepteurs P2Xn. Ceux-ci présentent une affinité pour l'ATP, un profil de désensibilisation et une cinétique d'activation et d'inactivation très différents. En effet, les récepteurs P2X1 à 6 ont une EC_{50} de l'ordre du micromolaire tandis que le récepteur P2X7 est sensible à des concentrations d'ATP de l'ordre d'une centaine de micromolaire. Au moins deux sous-types de récepteurs P2X, les récepteurs P2X4 et P2X7, peuvent également être modulés par des composés non nucléotidiques agissant comme des modulateurs allostériques positifs (Di Virgilio, Giuliani, et al. 2018; Stokes et al. 2020).

Cette famille de récepteurs possède une homologie de séquence peptidique de l'ordre de 30 à 50%. Les canaux sont formés par des multimères ou monomères de trois sous-unités composées généralement de la même protéine pour former un homotrimère, ou des protéines P2X différentes pour former un hétérotrimère (**Table 3**). Sur le plan topologique, chaque sous-unité présente des extrémités N et C-terminales intracellulaires présentant des motifs d'interaction avec des protéines kinases. Chaque sous-unité possède deux régions transmembranaires, la première étant impliquée dans la fermeture du canal et la seconde dans la sélectivité du pore ionique. La partie extracellulaire forme une grande boucle extracellulaire d'environ 280 acides aminés avec dix résidus cystéines conservés formant des ponts disulfures. On peut également noter la présence d'une région H5 hydrophobe, proche du vestibule du pore, potentiellement impliquée dans la modulation du récepteur canal par les cations. Pour finir, ils sont pourvus d'un site de liaison à l'ATP, se localisant à l'interface entre deux sous-unités et impliquant des régions de la boucle extracellulaire, adjacentes aux régions transmembranaires (**Figure 3**).

Récepteur	Agoniste préférentiel	Sous-unités hétéromériques fonctionnelles	Transduction du signal	Second messager intracellulaire	Expression tissulaire et cellulaire
P2X1	ATP	P2X2, P2X4 et P2X5	Canal ionique sélectif aux cations	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+	Neurones, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, lymphocytes, macrophages et plaquettes
P2X2	ATP	P2X3 et P2X6	Canal ionique sélectif aux cations	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+	Cellules excitables
P2X3	ATP	P2X2	Canal ionique sélectif aux cations	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+	Cellules excitables, neurones
P2X4	ATP	P2X6	Canal ionique sélectif aux cations	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+	Principalement exprimé dans le compartiment intracellulaire et dans les neurones centraux et périphériques, microglie, cellules endothéliales, cellules épithéliales, monocytes et cellules dendritiques
P2X5	ATP	P2X1	Canal ionique sélectif aux cations	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+	Cellules excitables et lymphocytes
P2X6	ATP	P2X2 et P2X4	Canal ionique sélectif aux cations	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+	Cerveau et muscles squelettiques
P2X7	ATP	P2X7	Canal ionique sélectif aux cations ou pore non sélectif	Augmentation du Ca^{2+} et du Na^+ ou entrée et libération de petites molécules organiques	Macrophages, cellules dendritiques, granulocytes polynucléaires, lymphocytes, MDSCs, microglie, ostéoblastes, ostéoclastes, astrocytes et cellules endothéliales, cellules épithéliales alvéolaires de type 1

Table 3 : Description des récepteurs P2X

Agoniste préférentiel, sous-unités hétérotrimériques fonctionnelles, signal de transduction, second messenger intracellulaire et expression cellulaire de chacun des récepteurs P2X. MDSCs : cellules suppressives dérivées de la myéloïde (*myeloid-derived suppressor cells*) (Burnstock and Knight 2004)

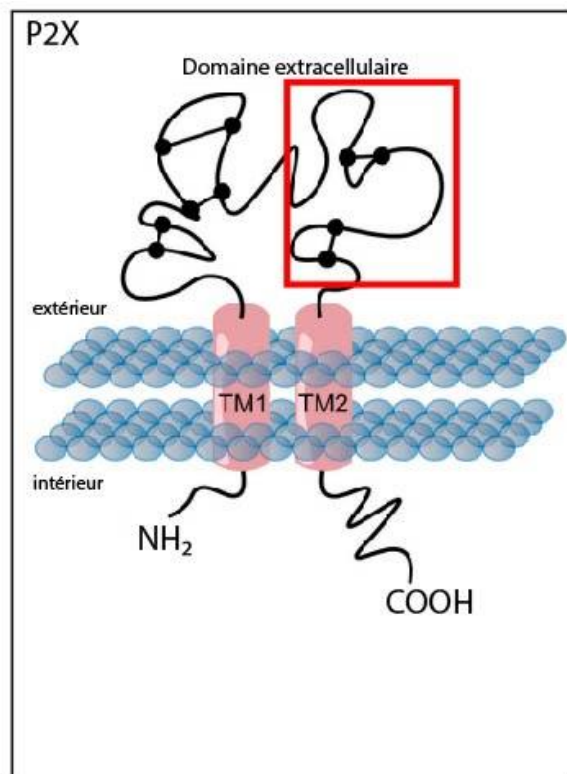


Figure 3 : Structure des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X constitués de trois sous-unités pour former généralement des homodimères ou plus rarement des hétérotrimères, forment ensemble un récepteur canal perméable après activation par des cations. La topologie d'une sous-unité est représentée ici. Chaque sous-unité est constituée de régions transmembranaires (TM1 et TM2), d'une grande boucle extracellulaire avec 10 résidus cystéines (points noirs), d'une queue N-terminale et d'une plus longue queue C-terminale. La partie H5 est située entre les acides aminés 320 et 340 (carré rouge). D'après (Vultaggio-Poma et al. 2022).

L'ATP est le seul agoniste physiologique connu pour tous les récepteurs P2X. L'ouverture des récepteurs P2X permet un important influx de Ca^{2+} et de Na^+ et un efflux de K^+ , ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , une surcharge cellulaire en Na^+ et une déplétion en K^+ . La perturbation de la distribution des ions monovalents entraîne une dépolarisation de la membrane qui peut à son tour déclencher l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage, favorisant ainsi un nouvel influx de Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} active une multitude de voies de transduction supplémentaires telles que les phospholipases, les MAPK et les enzymes dépendantes de la calmoduline. En outre, la forte baisse du K^+ intracellulaire provoquée par l'ouverture du récepteur P2X7 est un puissant stimulus pour l'activation de l'inflammasome NLRP3, et donc pour la maturation et la libération de l'IL-1 β et l'IL-18. L'activation des récepteurs P2X a également un rôle dans la neurotransmission et la nociception (**Figure 4**). En effet

l'ATP extracellulaire (ATPe) joue un rôle accessoire de neurotransmetteur rapide dans le système nerveux central où il agit principalement comme modulateur de la libération d'autres neurotransmetteurs. De plus la glie ainsi que les neurones expriment différents sous-types de récepteurs P2X, tels que P2X1 et P2X5, P2X4 principalement sur les astrocytes, le récepteur P2X7 sur la microglie et les oligodendrocytes et le récepteur P2X2 sur les neurones du tronc cérébral. Les récepteurs P2X2 et P2X3 se trouvent principalement dans les terminaisons nerveuses périphériques où ils interviennent dans la stimulation sensorielle. Les récepteurs P2X interviennent également que dans la cytotoxicité et la prolifération cellulaire comme il le sera décrit par la suite pour le récepteur P2X7.

Les récepteurs P2Y sont couplés et génèrent des messagers intracellulaires différents comme il l'a été mentionné précédemment. Comme les récepteurs P2X, les récepteurs P2Y sont distribués de manière ubiquitaire et exprimés par pratiquement tous les types cellulaires, qu'elles soient saines ou malignes, et participent à une multitude de réponses cellulaires, de la prolifération à la mort cellulaire, de la motilité à la différenciation, de la sécrétion de cytokines à la libération d'hormones (**Figure 4**).

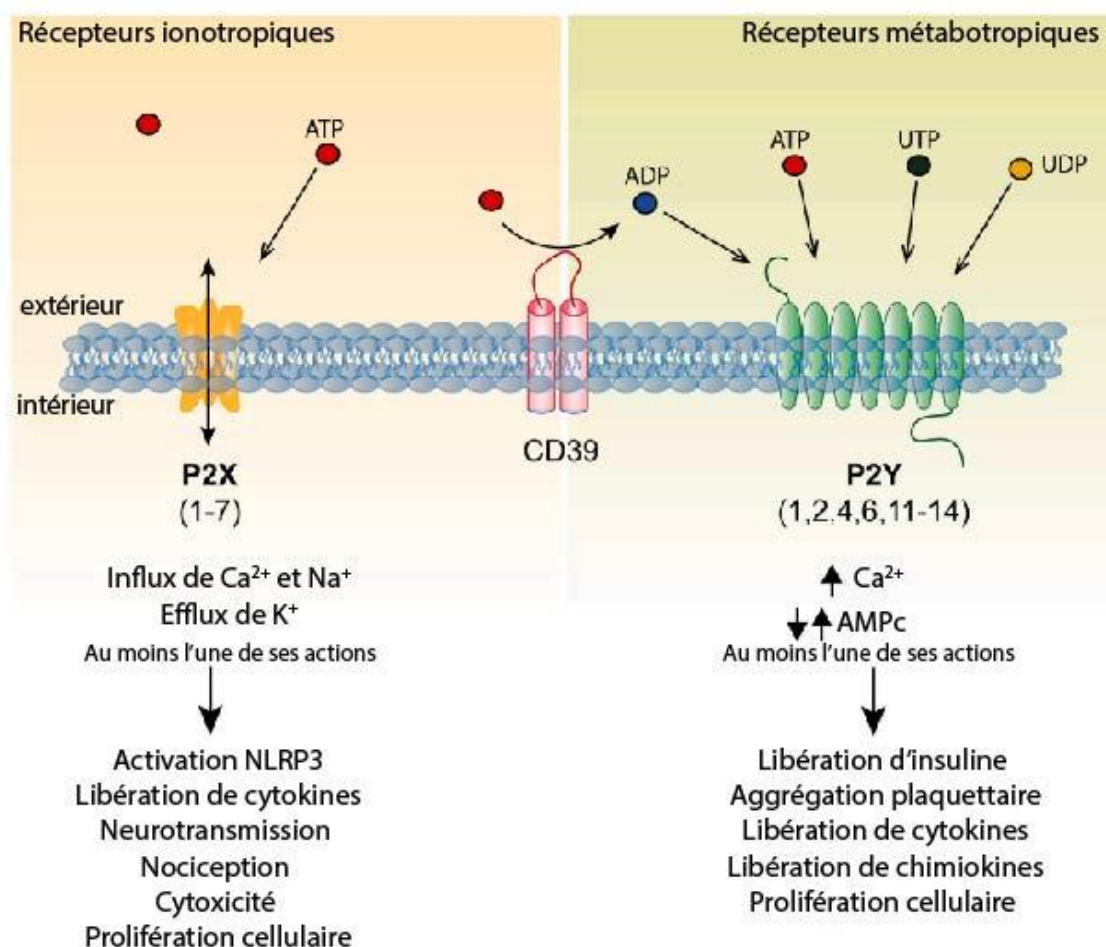


Figure 4 : Rôles des récepteurs P2

Les récepteurs P2X et P2Y sont souvent associés à la génération de messagers secondaires (flux d'ions, mobilisation de calcium intracellulaire ou modulation de la concentration d'AMPc). Cependant, l'augmentation de la concentration intracellulaire ionique causée par les récepteurs P2X peut aussi conduire à des réponses cellulaires plus tardives telles que la prolifération ou la libération de cytokines. L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} causée par la stimulation des récepteurs P2Y peut entraîner des réponses rapides telle que la sécrétion de neurotransmetteurs. Le seul nucléotide actif pour les récepteurs P2X est l'ATP, tandis que plusieurs nucléotides peuvent activer les récepteurs P2Y. CD39 joue un rôle central dans la signalisation purinergique car elle met fin à la stimulation des récepteurs P2X en hydrolysant l'ATP et génère l'ADP, un agoniste de certains des récepteurs P2Y (P2Y1, P2Y12/13). D'après (Vultaggio-Poma et al. 2022).

1.2. Structure et expression du récepteur P2X7

1.2.1. Distribution tissulaire et cellulaire

Chez l'homme, le récepteur P2X7 était initialement décrit comme principalement exprimé sur les cellules de la lignée hématopoïétique. Cependant, il apparaît désormais que le récepteur P2X7 a une distribution plus large, bien que les niveaux d'expression puissent varier de plusieurs ordres de grandeur. Dans les cellules hématopoïétiques, le récepteur P2X7 est exprimé, par ordre décroissant d'expression, par les macrophages suivis par les cellules dendritiques (DC), les monocytes, les cellules *natural killer* (NK), les lymphocytes B, les lymphocytes T (LT) et les érythrocytes (Sluyter 2015). Il est aussi présent sur les mastocytes et les éosinophiles tandis que les neutrophiles ne montrent aucune expression de surface mais semblent l'exprimer de façon intracellulaire. Enfin, P2X7 est également exprimé sur d'autres cellules dont l'origine s'apparente à celle des cellules hématopoïétiques, notamment les ostéoclastes et la microglie. P2X7 est présent sur les cellules épithéliales de la peau, du rein, du tractus urinaire et reproductif et de diverses glandes exocrines. Il est également exprimé par certaines régions du système nerveux central et périphérique avec un fort niveau dans la microglie en particulier après leur activation, mais il est aussi exprimé par les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (Cotrina and Nedergaard 2009). L'expression de P2X7 par les neurones est controversée mais serait possiblement exprimé dans les neurones de la moelle épinière (Wang et al. 2004) mais une absence dans les neurones corticaux (Cotrina and Nedergaard 2009). Cependant, les neurones du granule cérébelleux ainsi que les neurones de l'hypothalamus et de la substance noire (*substantia nigra*) expriment P2X7 (Sánchez-Nogueiro, Marín-García, and Miras-Portugal 2005). Les fibroblastes, les cellules endothéliales et les glandes exocrines (glandes salivaires et le pancréas) l'expriment également (Woods et al. 2012).

Chez le rat, le récepteur P2X7 est fortement exprimé dans le cerveau du nouveau-né et de l'adulte, dans la moelle osseuse, la rétine, les glandes salivaires, la glande parotide, les glandes lacrymales, les poumons, la rate, le pancréas, le foie, les testicules, l'épendyme, les neurones des noyaux olfactifs, le cortex cérébral, le striatum, le cortex piriforme, les noyaux septaux latéraux, les

cellules pyramidales, les oligodendrocytes, la microglie, les macrophages, et les ostéoclastes (Collo et al. 1997).

Chez la souris, le récepteur P2X7 est fortement exprimé dans la moelle osseuse, les glandes submandibulaires, les poumons, le foie, les reins, les macrophages, les granulocytes, les lymphocytes B, les mastocytes, la microglie, les cellules de Schwann, les ostéoclastes et les ostéoblastes (Collo et al. 1997).

1.2.2. Structure de P2X7

Le récepteur P2X7 a été initialement nommé P2Z afin de le distinguer des autres récepteurs P2X, en raison des concentrations plus élevées d'ATP (supérieures à 100 μ M) nécessaires pour l'activer (Gordon 1986). Le récepteur P2Z a été cloné pour la première fois à partir d'une bibliothèque d'ADNc de cerveau de rat en 1996 (Surprenant et al. 1996). Les 395 premiers acides aminés, tels que déduits de ce récepteur cloné, présentaient une homologie de séquence de 35 à 40% avec les six autres récepteurs P2X connus, ce qui a conduit à la reclassification du récepteur P2Z dans cette famille sous la dénomination de P2X7 (Surprenant et al. 1996). L'organisation du gène et sa localisation chromosomique ont été identifiés pour la première fois chez l'homme en 1998 (Buell et al. 1998). Le gène humain de P2X7 comprend 13 exons et est localisé sur le chromosome 12q24 proche du gène codant pour le récepteur P2X4, suggérant une origine par duplication de gène.

Après cette découverte chez le rat (Surprenant et al. 1996) le gène a été ensuite identifié et cloné chez d'autres espèces de mammifères. La comparaison des protéines correspondantes montre une homologie de séquence avec les protéines provenant de mammifères non humains de 77 à 97% et de 42 à 47% avec les protéines provenant des mammifères comparativement avec la protéine humaine. Chaque sous-unité du récepteur P2X7 chez le mammifère est composée de 595 acides aminés et comprend 2 domaines transmembranaires, une queue C-terminale, une queue N-terminale intracellulaires et une large région extracellulaire contenant le site de liaison à l'ATP (Jiang et al. 2013). Les sous-unités P2X7 s'assemblent principalement en tant que récepteur homotrimérique (Nicke 2008), mais dans certains cas elles peuvent s'assembler avec les sous-unités P2X4 pour former des récepteurs hétérotrimériques (Pérez-Flores et al. 2015).

Le cristal de la sous-unité du récepteur P2X7 du panda géant a été récemment caractérisé (Karasawa and Kawate 2016) (**Figure 5**). Ce cristal est obtenu sur la forme tronquée de P2X7. La structure globale est similaire à celle de la protéine P2X4 du poisson zèbre (Kawate et al. 2009) et à celle présente dans le récepteur P2X3 humain (Mansoor et al. 2016). Le cristal du récepteur P2X7 du panda a également permis de démontrer la structure trimérique du récepteur. Chaque sous-unité évoque la forme schématique d'un dauphin, la région extracellulaire (contenant 14 feuilletts β) et les

deux régions transmembranaires représentant respectivement le corps (avec la tête et les nageoires) et la queue (**Figure 5A**). Le récepteur trimérique à la forme schématique d'un « calice », les trois régions extracellulaires interagissant en plusieurs points et les régions transmembranaires formant des hélices individuelles, la seconde région transmembranaire (TM2) étant situé au centre pour former le pore du canal tandis que la première région transmembranaire (TM1) est quant à elle située à la périphérie du récepteur. Cette cristallographie a également permis de mettre en évidence une structure en « tourelle » composée des feuilletts $\beta 13$ et $\beta 14$ (**Figure 5C**). La fermeture de cette structure en forme de tourelle semble nécessaire pour induire un changement conformationnel du corps inférieur et l'ouverture ultérieure du canal. Ce processus peut être inhibé par certains antagonistes tel que A804598 (**Figure 5D**). La structure cristallographique du récepteur P2X7 de panda a été résolue à l'état fermé et sans ligand. Cependant, l'analyse du récepteur P2X4 du poisson zèbre à l'état basal, après fixation de l'ATP et dans sa conformation ouverte (Hattori and Gouaux 2012) a défini la base structurelle de liaison à l'ATP, de la perméabilité ionique et de la régulation du canal. Trois poches de liaison à l'ATP sont situées aux interfaces des sous-unités, chacune étant constituée de résidus conservés provenant de deux sous-unités adjacentes. L'occupation de ces sites par l'ATP ou par un agoniste induit des changements conformationnels de la région extracellulaire ce qui permet d'ouvrir le canal ionique formé par les trois TM2 (Wei et al. 2016). Les deux parties C- et N- terminales du récepteur P2X7 jouent un rôle important dans sa fonction. La partie N-terminale d'une longueur de 26 acides aminés, régule d'une part le flux de Ca^{2+} à travers le canal (Liang et al. 2015) et l'activation de kinases régulées par des signaux extracellulaires (Amstrup and Novak 2003a) et d'autre part le contrôle du déclenchement et de la stimulation des récepteurs P2X7 (Allsopp and Evans 2015). Le récepteur P2X7 possède la plus longue queue C-terminale de la famille des récepteurs P2X. Cette extrémité C-terminale de 239 acides aminés est essentielle à la fonction du récepteur, et contient un certain nombre de motifs ou régions établis et putatifs. La partie C-terminale semble également nécessaire à l'incorporation du récepteur dans les micro-domaines membranaires (radeaux lipidiques (Murrell-Lagnado 2017)) et à l'interaction avec de nombreuses protéines cytosoliques pour former un complexe de signalisation (Kim et al. 2001). Des études provenant de différents laboratoires montrent que la queue C-terminale est nécessaire pour la fonction du large pore (ou macropore) et donc pour la perméabilisation membranaire, mais pas pour l'activité canal cationique (Surprenant et al. 1996; Smart et al. 2003; Adinolfi et al. 2010). Cependant des travaux plus récents démontrent que ce n'est pas toujours le cas en fonction des conditions expérimentales, et suggèrent que l'absence de la queue C-terminale n'abolit pas mais ralentit la formation du macropore et par conséquent l'incorporation de molécules fluorescentes (Karasawa et al. 2017).

Plus récemment, des expériences de cryo electromicroscopie du récepteur P2X7 complet ont permis de mettre en évidence pour la première fois un aperçu de l'architecture du domaine cytoplasmique de ce récepteur. En plus de révéler comment la palmitoylation module directement la fonction de P2X7 pour empêcher la désensibilisation du récepteur, les structures révèlent de manière inattendue un complexe dinucléaire d'ions zinc et un site de liaison de nucléotide guanosine de haute affinité dans le domaine cytoplasmique (McCarthy, Yoshioka, and Mansoor 2019).

Le récepteur P2X7 possède un domaine d'interaction avec des lipides et il a été suggéré que le motif d'interaction lipidique de P2X7 sert non seulement de domaine de liaison pour le LPS, mais aussi pour les phospholipides, modulant ainsi la localisation du récepteur (Denlinger et al. 2001) comme dans les radeaux lipidiques. Une association entre P2X7 et les radeaux lipidiques a été étudiée dans les LT, où P2X7 est ADP-ribosylé par ART2.2 (Bannas et al. 2005). Juste en amont du motif de liaison au LPS, une étude de Gonnord et collaborateurs a identifié deux résidus cystéines palmitoylés (C572, C573) dans le P2X7 murin qui étaient essentiels au trafic à la surface cellulaire. De même, deux groupes plus proximaux de résidus cystéines (C477, C479, C482, C498, C499, C506) étaient palmitoylés et requis pour l'expression en surface du récepteur. La mutation des résidus cystéines juxtamembranaires C371, C373 et C374, cependant, n'a montré qu'une diminution de 50% de la palmitoylation et une localisation de surface réduite (Gonnord et al. 2009). La palmitoylation est une modification post-traductionnelle réversible qui augmente l'association membranaire et peut également affecter la fonction, la stabilité et le trafic subcellulaire des protéines dans les compartiments membranaires, comme par exemple les radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides.

Il est intéressant de noter que la perméabilité du récepteur P2X7 semble dépendre non seulement de l'extrémité C-terminale, mais aussi de la composition lipidique de la membrane cellulaire (Karasawa et al. 2017). Lors d'expériences *in vitro* avec le P2X7 tronqué purifié de panda dans des liposomes artificiels, le phosphatidylglycérol et la sphingomyéline ont facilité la perméation du YO-PRO-1, tandis que le cholestérol a eu un effet inhibiteur. Il a été conclu que les résidus cystéines palmitoylés dans les récepteurs complets empêchent l'effet inhibiteur du cholestérol en protégeant les domaines TM, tandis que dans le P2X7 tronqué en C-terminal, le cholestérol peut interagir avec les hélices transmembranaires et limite ainsi sa perméabilité. Ainsi, les propriétés de formation de pores du récepteur P2X7 pourraient être influencées par la modulation de la composition de la membrane et pourraient être spécifiques du type cellulaire (Di Virgilio, Schmalzing, and Markwardt 2018).

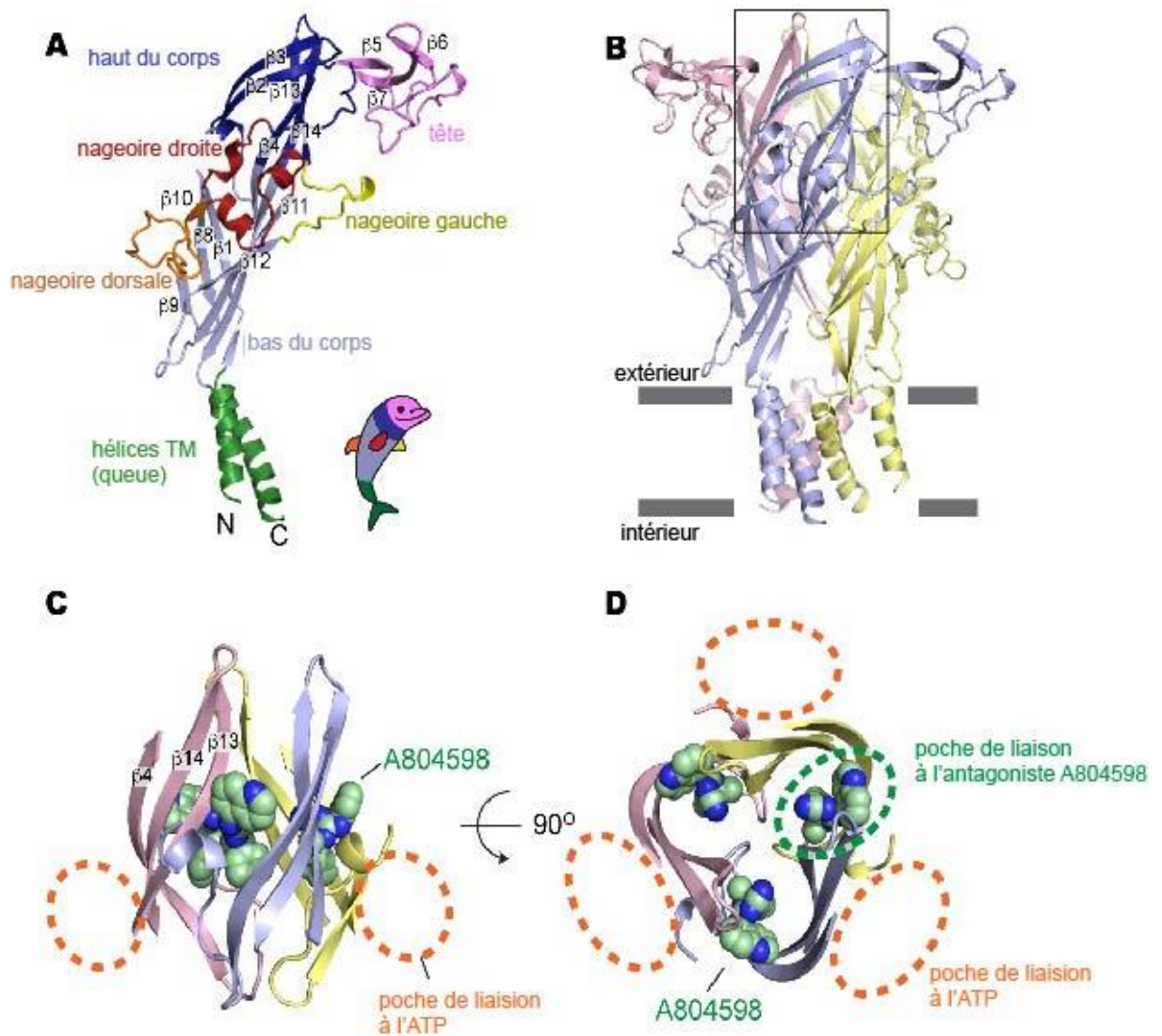


Figure 5 : Cristallographie du récepteur P2X7

(A) Représentation d'une des sous-unités du récepteur P2X7 du panda présentant une forme schématique de « dauphin ». On retrouve quatorze feuilletts bêta numéroté $\beta 1$ -14. (B) Représentation de la structure trimérique du récepteur P2X7 de panda, le carré noir représente l'emplacement approximatif des régions du corps supérieur présentées en C et D. (C) Vue latérale des régions du corps supérieur montrant les sites de liaison à l'ATP (lignes pointillées oranges). A804598, un inhibiteur de P2X7 est représenté sous forme de sphères. (D) Vue supérieure de la structure du récepteur P2X7 de panda par rapport aux poches de liaison à l'ATP (lignes pointillées oranges) et à l'une des poches de liaison à l'antagoniste (ligne pointillée verte). D'après (Karasawa and Kawate 2016).

1.3. Variants de P2X7

Chez l'homme, neuf variants d'épissage du gène *P2RX7* ont été décrits (de P2X7B à P2X7J), le variant P2X7 commun étant définie comme P2X7A (**Figure 6**). P2X7A code pour la forme canonique de taille entière (595 acides aminés). Les autres variants codent pour des protéines plus courtes. Les protéines issues des variants de P2X7B, P2X7H et P2X7J ont été étudiées (Adinolfi et al. 2010; Feng et

al. 2006). Trois d'entre eux, les variants C, E et G codent pour des protéines très courtes et sont supposés être incapables de former un canal récepteur. En revanche les variants B et J ont été décrits comme étant exprimés dans des conditions normales et/ou pathologiques et comme interférant avec les réponses biologiques induites par le récepteur P2X7 (Benzaquen et al. 2019). P2X7B, une isoforme tronquée fréquemment exprimée dans presque toutes les cellules eucaryotes, semblant être régulée dans les cellules immunitaires, contient 364 acides aminés et ne comporte pas les 249 acides aminés C-terminaux. Le récepteur résultant de l'assemblage de monomères de P2X7B montre une activité canal ionique mais semble incapable de former le macropore. Ce variant semble impliqué dans la prolifération cellulaire notamment des cellules tumorales (Adinolfi et al. 2010). Cependant, la co-expression de P2X7B avec P2X7A conduit à la formation du récepteur hétérotrimérique P2X7A-P2X7B avec une fonction de macropore. Cet hétérotrimère montre également une affinité plus importante pour l'ATP et une capacité plus élevée à promouvoir le métabolisme énergétique et la prolifération cellulaire. Tandis qu'une autre étude a démontré que les cellules exprimant à la fois les isoformes P2X7A et P2X7B étaient moins enclines que les cellules exprimant uniquement P2X7A à former un macropore, alors qu'elles conservaient la même capacité de canal ionique (Benzaquen et al. 2020). Ce résultat ne confirme pas ce qui a été publié précédemment indiquant que l'expression de P2X7B module positivement la fonction de P2X7 (Adinolfi et al. 2010) mais ils confirment que l'expression de P2X7B pourrait occulter l'activité de macropore de P2X7 (Ulrich et al. 2018; Ziberi et al. 2019). Le variant P2X7H a une longueur de 274 acides aminés et ne semble pas s'assembler en tant que récepteur fonctionnel (Cheewatrakoolpong et al. 2005). Le variant P2X7J est long de 258 acides aminés et peut s'assembler avec P2X7 pour former un récepteur hétérotrimérique non fonctionnel ce qui pourrait protéger certains types cellulaires de la mort cellulaire induite par l'ATP, comme les cellules épithéliales oculaires et des cellules malignes (Feng et al. 2006; Guzman-Aranguéz, Pérez de Lara, and Pintor 2017). **(Figure 6).**

Le récepteur P2X7 exprimé à la surface des cellules malignes possède une conformation non fonctionnelle. La première description de l'expression d'un récepteur P2X7 non fonctionnel (nfP2X7) a été faite dans les lésions cancéreuses. Dans cette étude un anticorps conçu contre un épitope situé dans la boucle extracellulaire proche de la poche de liaison de l'ATP et qui est inaccessible dans les cellules exprimant un récepteur P2X7 fonctionnel a permis de mettre en évidence ce récepteur (Barden et al. 2003). nfP2X7 a été également décrit par Gilbert et collaborateurs dans un panel de lignées cellulaires tumorales en utilisant un nouvel anticorps humanisé (BIL03) spécifique de la région extracellulaire du récepteur nfP2X7 (Gilbert et al. 2019). nfP2X7 est caractérisé par l'exposition d'un épitope normalement caché, E200, et par une absence d'ouverture du macropore. Ce variant est nécessaire à la survie de plusieurs lignées cancéreuses potentiellement grâce à sa fonction canal

ionique qui reste conservée. En effet, dans le TME, on observe une augmentation de la concentration d'ATP extracellulaire qui semble permettre la délocalisation du variant nfP2X7 intracellulaire vers la membrane plasmique. Ce dernier n'entraînant pas la mort cellulaire provoquée par l'ouverture macropore, il confère ainsi un avantage de survie aux cellules cancéreuses. Il est montré dans cette étude que nfP2X7 est exprimé largement à la surface de nombreuses cellules cancéreuses et dans un large spectre de tumeurs. Cependant le variant d'épissage codant pour la forme non fonctionnelle du récepteur n'est pas encore connu.

Quatre variants d'épissage ont été décrits pour le récepteur P2X7 murin (P2X7b, P2X7c, P2X7d et P2X7k), P2X7a la forme canonique représentant la protéine entière correspondante (**Figure 6**). Les variants P2X7b et P2X7c ont une longueur de 431 et 442 acides aminés respectivement (Haanes, Schwab, and Novak 2012; Kido et al. 2014; Masin et al. 2012). Ils sont tronqués dans la partie C-terminale dû à un épissage alternatif conduisant à l'exclusion de l'exon 13. Ils forment des récepteurs ayant conservés l'activité canal et n'ont pas la faculté de former un macropore (Masin et al. 2012). Le variant P2X7d est composé de 153 acides aminés et, comme observé pour le variant P2X7b, il peut inhiber l'activité basale de la sous-unité P2X7 complète (Kido et al. 2014).

P2X7k a une longueur de 592 acides aminés (Nicke et al. 2009) et s'assemble en récepteur ayant une activité plus importante et une plus grande sensibilité aux agonistes que P2X7a (Schwarz et al. 2012; Xu et al. 2012). Des résultats similaires ont été initialement observés avec le variant P2X7k du rat (Nicke et al. 2009). Le variant P2X7k échappe à la délétion dans la souris déficiente pour P2X7 « GlaxoSmithKline » (Nicke et al. 2009). En effet, le variant P2X7k est exprimé dans les LT (Schwarz et al. 2012; Xu et al. 2012) et expriment un récepteur P2X7 fonctionnel. Ce variant diffère du P2X7a par 42 acides aminés englobant la région cytosolique N-terminale et une partie du TM1. Sur le plan fonctionnel, on a constaté que le variant P2X7k était 8 à 10 fois plus sensible aux agonistes de P2X7 que le variant P2X7a. Il déclenche rapidement la perméabilisation de la membrane mesurée par l'incorporation d'éthidium. De plus, il est exprimée de manière plus sélective, le variant P2X7k est le variant prédominant exprimé par les LT tandis que P2X7a est le variant prédominant exprimé par les macrophages (Xu et al. 2012).

Il existe deux souches de souris dans lesquelles le gène P2X7 a été perturbé l'une provient de Glaxo, avec un gène LacZ et une cassette néomycine (Neo) insérés dans l'exon 1, et l'autre de Pfizer, avec une insertion Neo dans l'exon 13 (Solle et al. 2001; Sim et al. 2004). Certaines différences importantes, inexpliquées au départ, ont été signalées pour les deux souches. Par exemple, les macrophages des souris Pfizer présentent une forte réduction de la production d'IL-6 stimulée par l'ATP tandis que les macrophages des souris Glaxo présentent une très forte augmentation de la

production d'IL-6 (Chessell et al. 2005). Dans un modèle de sclérose en plaques (EAE) chez la souris, les souris Pfizer ont montré une exacerbation de la maladie. En revanche, les souris Glaxo ont montré une réduction de l'incidence de la maladie (Sharp et al. 2008). Les LT des souris Glaxo ont étonnamment produit une plus grande libération d'IFN- γ et d'IL-17 que les cellules sauvages, et des réponses médiées par le récepteur P2X7 ont été trouvées dans les LT des souris Glaxo KO par rapport aux cellules sauvages (Taylor et al. 2009). Un hybride de P2X7 a été décrit dans la souris déficiente pour P2X7 « Pfizer ». Cet hybride est une conséquence de la manipulation génétique entre une sous-unité P2X7 tronquée et une partie du vecteur utilisé pour déstabiliser le gène *p2rx7*, et forme également des récepteurs avec une faible activité canal (Masin et al. 2012). Dans la souris déficiente pour P2X7 de Lexicon Pharmaceuticals, une lignée générée en ciblant les exons 2 et 3 de P2X7, l'échappement de certains variants de P2X7 n'est pas encore connu (Basso et al. 2009). Ainsi la souris de Lexicon Pharmaceuticals peut ne pas exprimer de variants de P2X7. En outre, toutes les versions connues du récepteur P2X7 murin restent absentes dans une souris humanisée pour le récepteur P2X7 après inactivation du récepteur humanisé par la recombinaise Cre (Metzger et al. 2017).

De plus, dans notre projet INCA, il a été généré des souris déficientes pour P2X7 ainsi que des souris génétiquement modifiées afin d'inhiber le récepteur P2X7 dans des tissus ou des populations cellulaires particulières avec notamment des souris Tau déficientes pour P2X7 dans des modèles de Tauopathies (Carvalho et al. 2021).

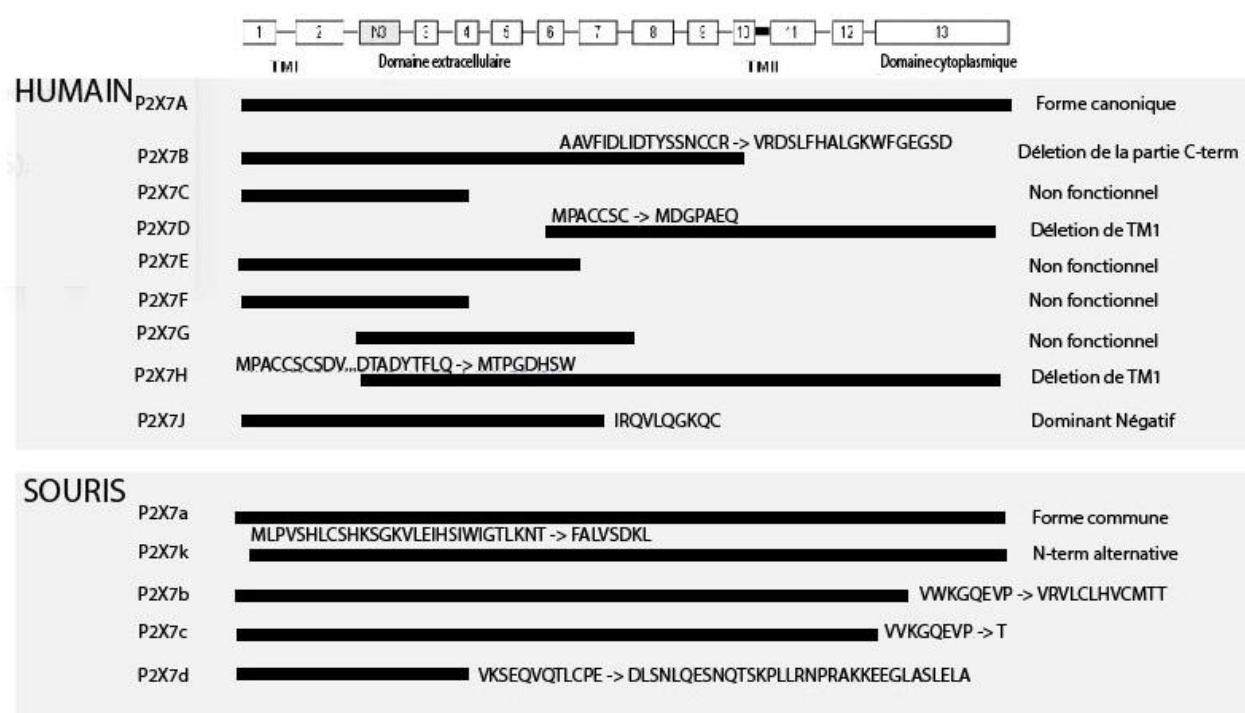


Figure 6 : Variants du récepteur P2X7 chez l'humain et la souris.

Liste et taille des variants humains et murins ainsi que leurs mutations. D'après (Benzaquen et al. 2019)

1.4. Polymorphisme de P2X7

1.4.1. Polymorphisme humain

Le récepteur P2X7 humain est polymorphique avec un certain nombre de mutations faux-sens (substitution ou non synonymes). Les premières études sur l'activité des récepteurs P2X7 dans les lymphocytes (Wiley et al. 1992) et les macrophages (Lammas et al. 1997b) ont révélé que certains individus présentaient des réponses médiées par les récepteurs P2X7 déficientes dans ces cellules. D'autres études ont mis en évidence que l'activité de P2X7 dans les leucocytes varie entre les individus (Gu et al. 2000; Wiley and Dubyak 1989), variations qui ne s'expliquent pas par les différences d'expression de P2X7 à la surface des cellules. Le séquençage ultérieur du gène *P2RX7* humain a permis d'identifier la présence d'un SNP faux-sens codant pour une substitution en position 496 de l'acide glutamique en alanine qui entraîne une perte de fonction du récepteur (Gu et al. 2001). Depuis cette découverte, un total de seize SNP codants pour des mutations faux-sens ont été caractérisés dans la région codante du gène *P2RX7* humain et nombre d'entre elles sont associées à une augmentation ou une diminution de susceptibilité aux maladies. La conséquence d'une mutation SNP présente sur l'un des allèles sur la fonctionnalité du récepteur P2X7 est difficile à prédire sans prendre en considération l'allèle sauvage co-exprimé chez les individus hétérozygotes. Par exemple, l'expression de la forme mutée Q460R, conduit à une activité semblable à l'allèle sauvage ou partiellement réduite (Stokes et al. 2010; Roger et al. 2010). Cependant, lorsque ce mutant est co-exprimé avec l'allèle sauvage dans les cellules hétérologues HEK-293, l'activité du récepteur P2X7 est plus fortement réduite qu'elle ne l'est lorsque le mutant Q460R est exprimé seul (Aprile-Garcia et al. 2016). Inversement, la co-expression de l'allèle mutant Q460R avec des allèles codant pour des mutations perte de fonction E496A ou I568N augmente l'activité du récepteur P2X7 dans les monocytes humains par rapport à la co-expression de l'allèle Q460 de type sauvage avec ces mêmes allèles perte de fonction (Denlinger et al. 2006).

Une autre considération concernant l'activité du récepteur P2X7 est la transmission des SNP dans le déséquilibre de liaison ou les haplotypes. Cinq haplotypes, représentant 99% des sujets, ont été identifiés initialement chez les caucasiens (**Figure 7**) (**Table 4**) (Fuller et al. 2009), avec une autre étude étendant le nombre d'haplotypes à six (Backlund et al. 2012) pour tenir compte du rare SNP codant pour la mutation perte de fonction, I568N. Parmi les cinq haplotypes initiaux, P2X7-1 a été défini comme l'haplotype sauvage, P2X7-2 et P2X7-4 comme gain de fonction (dû principalement à la mutation A348T cependant l'allèle T est retrouvé chez les primates et semblerait donc correspondre à l'allèle sauvage) et P2X7-3 et P2X7-5 comme perte de fonction (dû aux mutations E496A et T357S, respectivement) (Stokes et al. 2010).

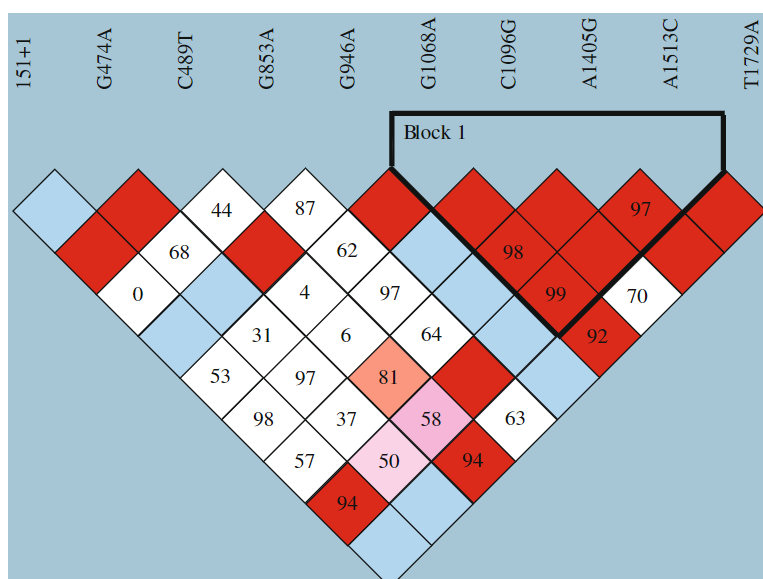


Figure 7 : Analyse haploview du déséquilibre de liaison dans le gène *P2RX7*.

Cet *haploview* utilise dix SNP marqueurs qui modifient la fonction des récepteurs. Les couleurs représentent le score D'/LOD relatif, où le rouge vif correspond à $D'=1$; $LOD \geq 2$ et le bleu à $D'=1$; $LOD < 2$, les nuances de rose à $D' < 1$; $LOD \geq 2$, le blanc à $D' < 1$; $LOD < 2$. Les chiffres représentent les scores D' pour le déséquilibre de liaison par paires. D'après (Fuller et al. 2009).

	1068	1096	1405	1513	Fréquence
Haplotype 1	G	C	A	A	0,341
Haplotype 2	A	C	A	A	0,226
Haplotype 3	G	C	A	C	0,185
Haplotype 4	A	C	G	A	0,173
Haplotype 5	G	G	A	A	0,075

Table 4 : Haplotypes présent dans 99% de la population caucasienne

Position, Acide aminé et fréquence des cinq haplotypes les plus fréquemment retrouvés dans la population caucasienne. D'après (Fuller et al. 2009).

1.4.2. Polymorphismes murins

La caractérisation des polymorphismes murins n'est pas étudiée. En effet, seuls ceux exprimés par les souches de souris consanguines utilisés en laboratoire peuvent être étudiés, ce qui entraîne le peu de caractérisation de ceux-ci. Un SNP codant pour une mutation faux sens (P451L) a été caractérisé dans le récepteur P2X7 murin. Cette mutation entraîne une activité fonctionnelle réduite (Adriouch et al. 2002; Young, Pelegrin, and Surprenant 2006). Ce SNP est pertinent dans les souches de souris utilisées en laboratoire. Par exemple, l'allèle correspondant à la forme P451 est présent chez BALB/c, NOD et les souches 129, tandis que l'allèle correspondant à la mutation L451 est présent dans les souches C57BL, DBA et CH3 (Adriouch et al. 2002; Syberg, Schwarz, et al. 2012). Cependant, il est à

noter qu'une autre étude a observé des réponses aux agonistes et des profils pharmacologiques similaires entre les récepteurs P2X7 provenant des lignées BALB/c et C57BL/6 exprimés de manière stable dans la lignée astrocytaire 1321N (Donnelly-Roberts, Namovic, Han, et al. 2009). Néanmoins, du fait de l'expression de P2X7 à la surface des ostéoclastes, la mutation P451L est associée à une réduction de la densité osseuse (Syberg, Schwarz, et al. 2012). Cela est également le cas chez les souris déficientes pour P2X7 avec des différences plus importantes entre les BALB/c sauvages et celles déficientes pour P2X7 en comparaison aux différences observées entre les lignées C57BL/6 sauvages et C57BL/6 déficientes pour P2X7 (Syberg, Petersen, et al. 2012). Finalement, la mutation P451L impacte également l'homéostasie du glucose, avec une tolérance au glucose et une réponse à l'insuline altérée chez les souris congéniques P451L par rapport aux souris sauvages 129Sv (Todd et al. 2015). Le mécanisme par lequel la mutation P451L modifie l'activité du récepteur P2X7 n'est pas complètement connu. Lorsque cette mutation est artificiellement introduite dans le contexte du récepteur P2X7 humain, celle-ci ne semble pas affecter son activité fonctionnelle (Adamczyk et al. 2015).

1.5. Formation du macropore

Les mouvements déclenchés par les ligands de P2X7 sur les domaines TM2 des sous-unités du récepteur P2X7 permettent d'ouvrir le canal ionique conduisant alors à l'influx de Na^+ et Ca^{2+} et à l'efflux de K^+ . La stimulation prolongée du récepteur P2X7 pendant des dizaines de secondes ou de minutes entraîne, une augmentation importante de la perméabilité membranaire à des molécules de plus grandes tailles pouvant atteindre 900 Daltons. La formation de ce « large pore » ou macropore a été initialement décrite dans les cellules immunitaires en 1979, avec l'observation que l'ATP permettait de perméabiliser les membranes cellulaires et permettait de faire pénétrer différentes catégories de molécules (Cockcroft and Gomperts 1979) (Gomperts 1983). Outre ces cellules immunitaires qui expriment naturellement le récepteur P2X7, l'expression hétérologue dans des cellules transfectées leur conféraient la capacité de former un macropore induit par l'ATP (Surprenant et al. 1996). Cette formation de macropores a également été observée dans une moindre mesure lors de l'activation prolongée d'autres récepteurs P2X, notamment les récepteurs P2X2, P2X2/3, P2X2/5 et P2X4 (Khakh et al. 1999; Virginio et al. 1999; Compan et al. 2012). Cette observation a inspiré l'hypothèse selon laquelle les macropores se forment parallèlement à l'ouverture rapide du canal ionique, mais ces hypothèses restent à être confirmées. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation du macropore :

i) la dilation progressive du canal ionique formé par P2X7 lui-même à la suite d'une activation prolongée ou répétée du récepteur par l'ATP. La dilatation du macropore membranaire de P2X7 est corroborée par l'observation dans des expériences de patch clamp sur cellules entières de l'entrée d'un cation de taille plus importante, le N-méthyl-D-glucamine (NMDG, d'une masse de 195 Da)

devenait plus perméable au cours du temps, pendant l'application d'ATP (Yan et al. 2008). Lorsque de fortes concentrations en ATP se lient au récepteur P2X7 un influx de cations et des cascades de signalisation intracellulaire ont lieu. La structure en hélices α dans la région TM2 prend alors une configuration permettant le passage de molécules jusqu'à 900 Da, le canal agissant transitoirement comme un macropore. Des études de patch clamp ont permis non seulement d'éviter l'altération des courants dépendants du récepteur P2X7, mais aussi d'observer directement les effets des modulateurs sur la conductance et la probabilité d'ouverture des canaux ioniques du récepteur P2X7. Dans les ovocytes exprimant de façon hétérologue le récepteur P2X7 humain, les canaux cationiques ayant une conductance d'environ 10 pS et un diamètre de pore de 8,5 Å ont été fermés par l'ATP⁴⁻ en quelques ms (Riedel, Schmalzing, and Markwardt 2007). Des canaux activés par l'ATP de conductance similaire ont été enregistrés précédemment dans les macrophages (Buisman et al. 1988), les mastocytes (Tatham and Lindau 1990) et les lymphocytes B (Markwardt et al. 1997). L'élimination de Na⁺, Cl⁻ ou H⁺ extracellulaires a augmenté la probabilité d'ouverture du canal du récepteur P2X7 en prolongeant le temps que le canal passe à l'état ouvert (élimination de Na⁺ (Riedel, Schmalzing, and Markwardt 2007)) ou en raccourcissant les temps à l'état fermé (élimination de Cl⁻ (Kubick, Schmalzing, and Markwardt 2011)) ou de H⁺ (Flittiger et al. 2010). De plus des mesures de courant monocanal ont démontré que le récepteur P2X7 humain n'est pas perméable aux anions (Kubick, Schmalzing, and Markwardt 2011). Une analyse électrophysiologique plus récente a clairement démontré que les petits (Ca²⁺ ou Na⁺) et les plus gros cations (NMDG⁺ ou spermidine) traversent sans délai le macropore du récepteur P2X7 (Harkat et al. 2017; Pippel et al. 2017). Ce point de vue est étayé par des expériences portant sur les propriétés de perméabilité des récepteurs formés par l'assemblage de sous-unités P2X7 mutées ou tronquées : celles-ci annulaient l'absorption de marqueurs fluorescents et diminuaient également de manière drastique les flux de cations (Smart et al. 2003; Adinolfi et al. 2010; Becker et al. 2008).

ii) le recrutement d'une protéine accessoire formant un pore en aval de l'activation de P2X7 (Pelegri and Surprenant 2006; North 2002). P2X7 serait uniquement responsable de la perméabilité aux cations de petite taille. Il interagirait directement ou par l'intermédiaire de seconds messagers avec une protéine canal permettant la perméabilité à des cations de plus grande taille. Les héli-canaux de la pannexine-1 font partis des protéines activées par P2X7 et associées à l'ouverture du pore permettant le passage d'ions et de molécules comme l'ATP entre l'espace intracellulaire et l'espace extracellulaire. Cela permet alors une activation renforcée de P2X7 et induit des réponses physiologiques telles que la propagation d'ondes calciques cytoplasmiques. Une autre protéine accessoire, la connexine-43, a été proposée comme nécessaire à la formation de macropores associés à P2X7 (Beyer and Steinberg 1991). Cependant, les antagonistes de la connexine et de la pannexine-1 ainsi que les ARNsi dirigés contre la pannexine-1 ne permettent pas d'inhiber la formation de macropores dans des macrophages murins

(Alberto et al. 2013). De plus des souris déficientes pour la pannexine-1 ne permettent pas d'inhiber la formation du macropore. Une récente étude a également identifié l'Anoctamine 6 (ANO6), un autre canal cationique non sélectif, comme un nouvel acteur clé dans la formation de pores membranaires après activation du récepteur P2X7 dans les macrophages (Ousingsawat et al. 2015). L'implication de ANO6 dans la formation de pores médiée par P2X7 dans les LT reste à élucider. De plus l'activation de P2X7 conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3 entraînant alors le clivage de la gasdermine D (GSDMD). La GSDMD a été identifiée en 2015 comme l'exécuteur de la pyroptose activée par les caspases-1/4/5/11 (Shi et al. 2015; Broz, Pelegrín, and Shao 2019; Aglietti and Dueber 2017). La GSDMD entière comprend le domaine répresseur N-terminal (GSDMD-N) et C-terminal (GSDMD-C) qui interagissent entre eux en l'absence de stimulation. Cette conformation auto-inhibitrice est libérée lors d'un clivage au niveau d'un résidu d'acide glutamique conservé (D276 chez la souris et D275 dans la GSDMD humaine) par la caspase-1/4/5/11, divisant ainsi la GSDMD en GSDMD-N et GSDMD-C. La génération de GSDMD-N lui permet de s'insérer dans la membrane plasmique et de former des macropores oligomériques, ce qui entraîne la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 ainsi que la pyroptose. Kayagaki et ses collaborateurs et Shi et ses collaborateurs ont signalé que le potassium passe à travers la GSDMD qui forme des pores, ce qui entraîne l'activation de l'inflammasome NLRP3 pendant l'activation non canonique de l'inflammasome (Kayagaki et al. 2015; Shi et al. 2015).

Toutes ces données suggèrent que la formation du macropore peut être induite de manière intrinsèque au récepteur P2X7 lui-même ou en association avec des protéines accessoires. La part relative de ces deux types de mécanismes, et l'identité précise de ces protéines accessoires, dans chaque type cellulaire, reste cependant à être exploré plus précisément. (Di Virgilio et al. 2018).

2. Fonctions du récepteur P2X7

Le récepteur P2X7 remplit des fonctions variées dans de nombreuses populations cellulaires distinctes, voire au sein d'un même type cellulaire. Le récepteur P2X7 fonctionne en tant que canal cationique en réponse à l'ATP. Une brève activation de quelques secondes par son agoniste physiologique l'ATP, ou par son agoniste synthétique le BzATP, ouvre une voie cationique qui permet l'influx de Na⁺ et de Ca²⁺ et l'efflux de K⁺ (North and Surprenant 2003). Cela conduit alors à une forte augmentation de Na⁺ intracellulaire entraînant une dépolarisation membranaire. L'influx de Ca²⁺ augmente sa concentration intracellulaire et déclenche alors des voies de signalisation dépendantes du Ca²⁺. En parallèle, l'efflux de K⁺ diminue sa concentration cytosolique et favorise l'activation d'autres processus importants, tels que l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Sanz and Virgilio 2000). Initialement, le « large pore » ou macropore, associé à l'activation de P2X7, ne semblait être obtenue qu'après une stimulation prolongée du récepteur. Cependant, il semble désormais possible

que l'augmentation de la conductance se produisent sans délai après l'activation de P2X7 permettant ainsi des flux de cations de petite et grande taille simultanément (Riedel, Schmalzing, and Markwardt 2007). Une autre caractéristique des récepteurs P2X7 des mammifères est l'absence de désensibilisation suite à la stimulation répétée par ses agonistes. Elle conduit à l'inverse à une augmentation progressive de son activité, une propriété appelée facilitation (Roger, Pelegrin, and Surprenant 2008).

2.1. Stimulation de l'inflammasome et sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18

L'activation de P2X7 joue un rôle central dans les réponses immunitaires innées et adaptatives à travers la sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-1 β et IL-18 par les cellules d'origine myéloïde, notamment les cellules dendritiques, les macrophages et la microglie. L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3 inclue deux signaux : le priming et l'activation. Le processus de priming est dépendant des récepteurs de l'immunité innée tels que les PRR, et conduit à l'expression de NLRP3, pro-IL-1 β et pro-IL-18. Le signal 2 est nécessaire à la synthèse et l'assemblage de l'inflammasome, un complexe multiprotéique comprenant les protéines NLRP3, une protéine adaptatrice ASC et la procaspase-1 (Mariathasan et al. 2004). De multiples ligands peuvent stimuler l'activation de l'inflammasome. L'un des événements connus pour l'activer est l'efflux de potassium (qui peut être mimé par la nigericine). Le récepteur P2X7, en permettant l'efflux de K⁺ peut activer l'inflammasome NLRP3. L'ATP extracellulaire en activant l'inflammasome initie une cascade d'événements protéolytiques commençant par la conversion de la procaspase-1 en caspase-1, la transformation et la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18. En outre, la caspase-1 activée clive également la GSDMD pour libérer son domaine N-terminal, qui forme des pores au niveau de la membrane plasmique et sert de médiateur pour la libération de l'IL-1 β et de l'IL-18 matures. Ceci induit une forme rapide et pro-inflammatoire de mort cellulaire appelée « pyroptose » (Piccini et al. 2008) (**Figure 7**). Ce mécanisme sera détaillé dans la suite de ce manuscrit.

2.2. Libération d'espèces réactives de l'oxygène et activation de la voie NF- κ B

L'influx de Ca²⁺ à la suite de l'activation de P2X7 active des kinases permettant alors la phosphorylation de différentes protéines, notamment de NADPH oxydase (NOX) ce qui conduit ensuite à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La phosphorylation de la sous-unité NOX et la production de ROS ont été démontrées dans différents types cellulaires, notamment dans la microglie et les macrophages (Moore and MacKenzie 2009; Wang and Sluyter 2013). Ce mécanisme semble impliqué dans l'activation de kinases *via* un influx de Ca²⁺ (Martel-Gallegos et al. 2013). Après activation du récepteur P2X7, la production de ROS est augmentée. A leur tour, les ROS amplifient la signalisation dans le cytosol et dans le noyau. Dans le cytosol, les ROS activent de multiples kinases, notamment des

membres de la famille des MAPK comme JNK, p38 et ERK1/2 (Pfeiffer et al. 2007). Les ROS peuvent également activer la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) (Cruz et al. 2007). Les événements nucléaires déclenchés par les ROS comprennent la translocation du facteur de transcription NF- κ B (Ferrari et al. 1997) et la régulation de l'expression de gènes tel que le glutathion nécessaire pendant une réponse oxydative. Il est important de noter, que ces événements sont atténués en présence d'antioxydants (N-acétylcystéine ou ascorbate), ce qui suggère que la signalisation des ROS induite par l'activation du récepteur P2X7 est physiologiquement importante. Dans les cellules immunitaires telles que les macrophages (Lenertz et al. 2009; Pfeiffer et al. 2007; Noguchi et al. 2008; Da Cruz et al. 2006), les monocytes humains primaires (Lenertz et al. 2009) et les éosinophiles (Davide Ferrari, Idzko, et al. 2000), l'activation de P2X7 induit la production de ROS principalement en favorisant l'assemblage du complexe 2 de la NADPH oxydase (NOX2).

NF- κ B est un facteur de transcription exprimé dans presque tous les types cellulaires et joue un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires contre les infections. L'activation du récepteur P2X7 conduit à l'activation de NF- κ B qui contrôle l'expression de cytokines et l'apoptose. Cette activation dépendante de P2X7 semble nécessaire à la production de ROS. En effet, l'utilisation d'un antioxydant, la pyrrolidine dithiocarbonate (PDTC) inhibe cette voie. De même, l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase-1, YVAD, a permis de suggérer l'implication de cette protéase dans ce processus. De manière intéressante, l'activation de NF- κ B par la voie passant par P2X7 semble aboutir à la formation uniquement de l'homodimère p65 et non à la formation des homodimères p50 et des hétérodimères p50/p65 qui caractérisent classiquement la voie NF- κ B. Ceci suggère que les gènes cibles contrôlés par la voie P2X7 dépendante puissent ne représenter qu'une fraction des gènes dépendant de ce facteur de transcription. Ces données ouvraient ainsi la voie à un lien mécanistique entre P2X7 et la transcription de gènes dépendant de NF- κ B, au moins dans les cellules de la microglie utilisées comme modèle dans cette étude. D'autres études ultérieures ont ensuite montré que P2X7 pouvait amplifier l'activation de NF- κ B dans la lignée macrophagique RAW264 par un mécanisme impliquant la queue C-terminale de P2X7 et MyD88 (Liu, Xiao, and Li 2011). Enfin une étude portant sur l'évaluation d'un inhibiteur de P2X7 (AZD9056) utilisé dans un modèle d'ostéo-arthrite chez le rat, a permis d'établir à nouveau un lien entre P2X7 et la voie NF- κ B (Hu et al. 2016) (Ferrari et al. 1997).

2.3. Organisation et perméabilité membranaire

Le récepteur P2X7 a également des effets sur l'organisation et la perméabilisation membranaire. Il joue notamment un rôle dans l'exposition des phosphatidylsérines à la surface des cellules. Dans les tissus sains, ces phosphatidylsérines sont situées dans le feuillet interne de la membrane plasmique. A l'inverse, dans certaines conditions pathophysiologiques, telle que l'apoptose, des flippases sont activées et vont permettre la translocation des phosphatidylsérines à la

surface des cellules. Une activation brève de P2X7 va permettre une translocation réversible des phosphatidylsérines tandis qu'une activation prolongée du récepteur va entraîner une translocation irréversible et conduire à la mort cellulaire (Mackenzie et al. 2005). L'activation de P2X7 sur les LT provoque des modifications de volume cellulaire et de composition de la membrane plasmique, associé notamment à l'exposition précoce des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Taylor et al. 2008; Adriouch et al. 2001). Cette externalisation des phosphatidylsérines est liée à l'influx d'ions Ca^{2+} et Na^{+} qui inhibe les aminophospholipides translocases responsables du maintien de la phosphatidylsérine au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. De plus, il active simultanément les scramblases qui catalysent le mouvement bidirectionnel de la phosphatidylsérine dans la couche intermédiaire (Courageot et al. 2004; Bratton et al. 1997). L'activation prolongée de P2X7 conduit ensuite à la mort des LT, l'entrée de molécules liant l'ADN telle que l'iodure de propidium, peut être visualisée, associée à la perte de l'intégrité de la membrane. L'exposition des phosphatidylsérines après stimulation par l'ATP est réversible si l'ATP est éliminée durant les trente premières minutes de l'exposition (Mackenzie et al. 2005). Inversement, l'exposition des phosphatidylsérines par l'ADP-ribosylation de P2X7 est irréversible même après l'élimination du NAD^{+} (Scheuplein et al. 2009).

2.4. Stimulation des métalloprotéases

L'activation de P2X7 peut conduire à la perte de la L-selectine (CD62L), une molécule d'adhésion qui initie la fixation des leucocytes et donc une première étape dans la cascade d'adhésion et de migration des leucocytes (Elliott et al. 2005) (**Figure 8**). En plus de la perte de CD62L, l'activation de P2X7 entraîne la perte du récepteur de faible affinité au fragment Fc de l'immunoglobuline epsilon (CD23) (Pupovac et al. 2015), le récepteur du complément de type 2 (CD21) (Sengstake, Boneberg, and Illges 2006), le membre sept de la superfamille des récepteurs au TNF (CD27) (Moon et al. 2006), le récepteur à l'IL-6 (Garbers et al. 2011), CXCL16 (Pupovac, Foster, and Sluyter 2013) ainsi que la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM1) (Mishra et al. 2016). Ces pertes sont principalement liées à l'activation de métalloprotéases associées à la membrane, en particulier les protéines ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain-containing proteins*) 10 et ADAM 17. Ces deux protéines sont largement exprimées par les cellules immunitaires et leur activité est contrôlée par de nombreux mécanismes (Grötzinger, Lorenzen, and Dusterhöft 2017; Lambrecht, Vanderkerken, and Hammad 2018). De façon intéressante, il a été montré que l'exposition des phosphatidylsérines à la surface des cellules est requise pour l'activité des protéines ADAM17 (Sommer et al. 2016), que l'anoctamine-6 (ANO6) régule cette activité, (Veit et al. 2018) que la phosphorylation par ERK et p38 est importante pour son activation (Díaz-Rodríguez et al. 2002) et son trafic membranaire (Soond et al. 2005). Ainsi, il existe un lien direct entre l'activité des métalloprotéases et ces voies de signalisation

médiées par P2X7. Le récepteur P2X7 est également associé au bourgeonnement (« *cell blebbing* ») de la membrane plasmique. Ce bourgeonnement est issu de la formation de protrusions sphériques de la membrane plasmique, nécessitant le détachement et/ou la rupture locale du cortex d'actomyosine de la membrane (initiation du bourgeonnement) ainsi qu'une augmentation de l'activité de la myosine et de la pression intracellulaire (expansion du bourgeonnement). Bien que ce bourgeonnement soit généralement considéré comme une caractéristique de l'apoptose, il est aussi impliqué dans la migration cellulaire et la genèse des cytokines (Charras 2008; Paluch and Raz 2013). L'activation du récepteur P2X7 cause un bourgeonnement réversible dépendant de la queue C-terminale de P2X7 (Wilson et al. 2002) dans des systèmes natifs et recombinants (Mackenzie et al. 2005). P2X7 a également des effets sur le trafic et l'organisation de la membrane cellulaire. Cela inclut les phénomènes de microvésiculation (Mackenzie et al. 2001; Pizzirani et al. 2007), la libération d'exosomes (Qu and Dubyak 2009), la maturation de phagosome (Fairbairn et al. 2001) et la formation de cellules géantes multinucléées (Lemaire et al. 2006).

2.5. Stimulation de la phospholipase D et A2

La phospholipase D est localisée dans la membrane plasmique et catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine pour former l'acide phosphatidique, libérant ainsi la choline soluble dans le cytosol. La phospholipase A2, quant à elle, hydrolyse des phospholipides, libérant des lysophospholipides et de l'acide arachidonique qui est modifié en médiateurs inflammatoires, les eicosanoïdes. L'ATP stimule l'activité de la phospholipase D dépendante et indépendante du Ca^{2+} (El-Moatassim and Dubyak 1992; Gargett, Cornish, and Wiley 1996) et l'activité de la phospholipase A2 (Alzola et al. 1998) qui se produit dans les minutes après l'exposition des macrophages, des lymphocytes B ou des cellules du canal exocrine à l'ATP. L'activation de la phospholipase D médiée par P2X7 a été liée à d'autres effets en aval de P2X7, notamment dans les réponses antibactérienne suite aux infections par *Mycobacterium tuberculosis* (Kusner and Barton 2001) et par chlamydia (Coutinho-Silva et al. 2003). Elles impliquent toutes deux la fusion phagosome-lysosome (Kusner and Barton 2001), ainsi que le bourgeonnement membranaire et la libération de microvésicules (Thomas and Salter 2010).

2.6. Activation et Prolifération

P2X7 joue également un rôle dans l'activation et la prolifération cellulaire. Il est communément admis que l'activation du récepteur P2X7 se produit principalement dans des conditions physiopathologiques du fait de la nécessité de fortes concentrations d'ATP. Ce récepteur devrait donc théoriquement être principalement inactif dans les tissus sains. Cependant certaines données suggèrent que P2X7 est également impliqué dans la génération d'un niveau basal d'activation

dans les cellules en conditions physiologiques. Cette activité basale, stimulation tonique, établit l'équilibre ionique intracellulaire, soutient le métabolisme mitochondrial basal et donc la synthèse d'ATP, favorise la motilité et soutient la prolifération ou la différenciation cellulaire (Adinolfi et al. 2005; Borges da Silva et al. 2018). La stimulation tonique par de faibles niveaux d'ATP a permis d'hyperpolariser le potentiel mitochondrial, d'augmenter le contenu mitochondrial en Ca^{2+} et d'augmenter le contenu en ATP des cellules transfectées. Cet effet dépendait de l'extrémité C-terminale de P2X7 et il a été proposé qu'il soit dû à un transfert constant mais faible de Ca^{2+} dans les mitochondries, médié par P2X7 qui stimule alors les effets trophiques. A l'inverse, une forte stimulation de P2X7 provoque une surcharge et un effondrement du Ca^{2+} mitochondrial et entraîne alors la mort cellulaire (Adinolfi et al. 2005). Dans la microglie, la surexpression du récepteur P2X7 recombinant peut augmenter l'activation et la prolifération cellulaire (Monif et al. 2009). Dans les LT, la libération de l'ATP autocrine et la stimulation tonique de P2X7 contribuent également à l'activation des LT et à la synthèse d'IL-2 (Yip et al. 2009a).

Le rôle joué par le récepteur P2X7 dans la croissance tumorale n'est pas facile à rationaliser puisque ce récepteur est censé rendre les cellules tumorales susceptibles d'être éliminées par les concentrations élevées d'ATP que l'on trouve habituellement dans le microenvironnement tumoral. Cependant les cellules tumorales pourraient avoir contourner ce danger en mettant en œuvre de multiples stratégies, telles que l'augmentation des ecto-nucléotidases à la surface membranaire, l'augmentation du seuil d'ouverture du macropore de P2X7, le découplage de l'activation du récepteur P2X7 de la voie de mort intracellulaire, la synthèse d'isoformes de P2X7 dépourvues de la capacité de former le macropore ou une combinaison différente de ces mécanismes. Un des variants d'épissage de P2X7 dépourvu de l'extrémité C-terminale, P2X7B, est proposé comme médiateur des effets trophiques de P2X7 par l'activation du facteur de transcription NFATc1 (Adinolfi et al. 2010). Ce variant d'épissage est associé à l'expression d'un récepteur P2X7 incapable de former un macropore, mais qui reste capable de former un canal cationique et de permettre un influx calcique. Cependant, il peut potentialiser la fonction du variant P2X7A complet coexprimé, y compris la fonction du macropore (Adinolfi et al. 2010). Un grand nombre de preuves *in vitro* et *in vivo* indiquent que le récepteur P2X7 est le médiateur d'effets trophiques et de stimulation de la croissance. Les expériences précliniques montrent que la croissance tumorale et, dans certains cas, la formation de métastases peuvent être inhibées par l'administration de molécules antagonistes de P2X7 (Lara et al. 2020; Adinolfi et al. 2009; 2015; Amoroso et al. 2012; Ziberi et al. 2019; Brisson et al. 2020). Biochimiquement, l'effet trophique de P2X7 n'est pas clair, bien que plusieurs voies favorisant la croissance aient été associées à l'expression ou à l'activation de P2X7. La transfection de ce récepteur augmente l'activité de NFAT et NF- κ B, les niveaux de Ca^{2+} de la matrice mitochondriale et la production d'ATP et active l'oncogène c-

myc (Adinolfi et al. 2005; 2009). Dans les cellules de neuroblastome, la stimulation du récepteur P2X7 renforce la voie PI3K/Akt et réduit l'activité de GSK3 β (Amoroso et al. 2015). Ces effets sont inversés par l'inhibition du récepteur P2X7 ou par des antagonistes de ce récepteur.

2.7. Mort cellulaire

Le récepteur P2X7 est impliqué dans l'induction de la mort cellulaire ce qui a valu à ce récepteur d'être qualifié de « récepteur cytolitique » (Surprenant et al. 1996). La stimulation prolongée de P2X7 induit une mort cellulaire d'abord qualifiée d'apoptose ou aponécrose (**Figure 8**). Cependant plusieurs autres formes de morts cellulaires alternatives ont été récemment décrites telles que la pyroptose, la nécroptose ou la mort cellulaire autophagique (Yang et al. 2015; Young et al. 2015). Tandis que le gonflement cellulaire et la formation du macropore peuvent expliquer les propriétés du récepteur P2X7 à perméabiliser la membrane plasmique, les mécanismes exactes des formes de morts cellulaires ne sont pas connus en détail. Néanmoins, des marqueurs typiques de l'apoptose tels que la libération de cytochrome C, la délocalisation des phosphatidylsérines, le bourgeonnement membranaire et le clivage des caspases 3, 8 et 9 ont été décrits dans de nombreux systèmes (Ferrari, Chiozzi, et al. 1997; Humphreys et al. 2000; Mackenzie et al. 2005). De plus comme décrit précédemment on connaît maintenant le lien clair entre l'activation de P2X7 et la pyroptose dans les cellules myéloïdes qui expriment NLRP3 et P2X7, conduisant au travers de la caspase-1 à induire une pyroptose GSDMD dépendante.

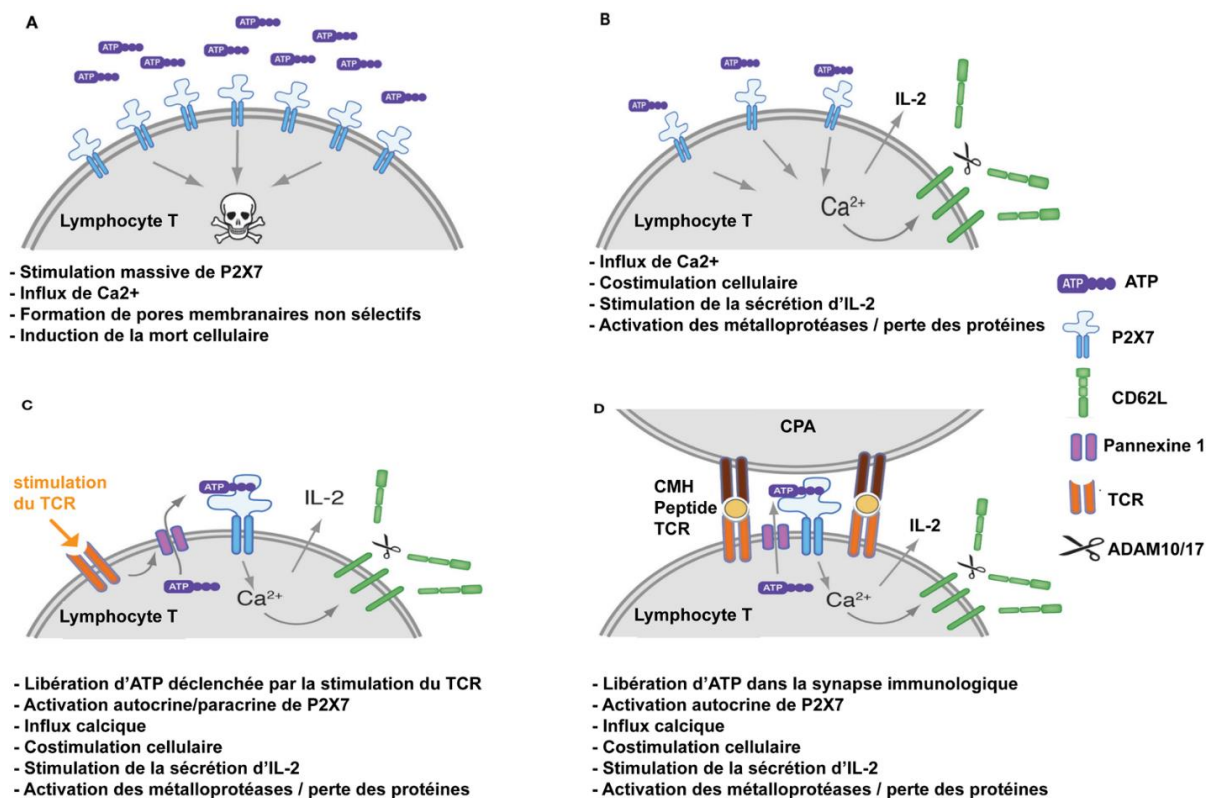


Figure 8 : Principales fonctions de P2X7 dans les LT : Modulation du phénotype des LT, de la réponse à la stimulation mitogénique et régulation de la survie

La stimulation de P2X7 peut entraîner différentes conséquences qui dépendent de la concentration extracellulaire d'ATP, de la densité du récepteur P2X7, de l'expression d'ATPases notamment CD39, de la nature du sous-groupe de LT et de leur état d'activation. (A) De fortes concentrations extracellulaires d'ATP conduisent à l'induction de la mort cellulaire, probablement par dépolarisation et perméabilisation massive de la membrane. (B) Dans le cas de plus faibles concentrations d'ATP et/ou une plus faible expression de surface de P2X7 et/ou une forte concentration d'enzymes catabolisant l'ATP, l'activation de P2X7 pourrait participer à la costimulation des LT en augmentant le niveau intracellulaire du second messager, le Ca^{2+} . Cela peut entraîner la stimulation de NFAT, MAPK et la sécrétion d'IL-2, ainsi que l'activation de métalloprotéases qui catalysent le relargage de CD62L et d'autres protéines de surface cellulaire. (C) Dans certaines études, il a été démontré que la stimulation du TCR par des activateurs mitogéniques favorise la libération d'ATP par la pannexine-1, ce qui favorise la costimulation autocrine/paracrine des LT. La stimulation du TCR stimule la translocation de la pannexine-1 au niveau de la synapse immunologique. (D) Ce mécanisme peut donc fournir un signal tonique de costimulation pendant l'activation physiologique d'un LT en contact avec une cellule présentatrice d'antigènes (CPA), en favorisant la libération locale d'ATP dans la synapse immunologique et l'activation locale des récepteurs P2X exprimés à la surface des LT et des CPA. D'après (Rissiek et al. 2015).

Par ses rôles dans la libération d'interleukines, la prolifération et la mort cellulaire, le récepteur P2X7 semble jouer un rôle important dans les troubles inflammatoires chroniques, dans les dysfonctionnements métaboliques tels que le diabète de type 2, dans les maladies neurodégénératives et le cancer. Ces aspects seront approfondis dans la suite de ce manuscrit.

3. Sources et devenir des molécules capables d'activer P2X7

3.1. L'ATP

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) est le principal ligand naturel du récepteur P2X7 chez l'homme et chez la souris. Elle est presque exclusivement présente dans le milieu intracellulaire à de fortes concentrations allant de 1 à 10 mM. Dans le milieu extracellulaire, les concentrations d'ATP sont significativement plus faibles, de l'ordre du nanomolaire (Trautmann 2009). L'ATP étant la source majeure d'énergie de la cellule, et de transfert d'électrons. L'ATP peut être libérée dans l'environnement extracellulaire en cas d'apoptose et de nécroptose, de manière passive à travers la membrane des cellules mortes. Ce nucléotide peut également être libéré par les cellules vivantes lors de dommages ou de stress cellulaires. Cette libération peut se faire en réponses à différents types de stress, par des stimulations mécaniques (Homolya, Steinberg, and Boucher 2000), par l'hypoxie ou lors d'infection par des organismes pathogènes (McNamara et al. 2001). Celle-ci se produit *via* plusieurs mécanismes spécifiques comprenant l'exocytose de granules de sécrétion, le transport vésiculaire, au travers de canaux membranaires tels que les transporteurs ABC (ATP binding cassette), les pannexines (Chekeni et al. 2010) et les connexines (Anselimi et al. 2008). L'ATP et ses dérivés jouent donc un rôle

important en tant que molécules de signalisation, participant à des voies autocrines et paracrines. Celles-ci régulent le métabolisme cellulaire, la migration, la prolifération et l'apoptose par des voies de signalisation déclenchées *via* les récepteurs P2Y et P2X purinergiques/pyrimidinergiques de type 2. (Figure 9)

3.2. Le NAD⁺

Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) comme l'ATP est un métabolite intracellulaire jouant un rôle central dans le métabolisme. La concentration intracellulaire du NAD⁺ est autour de 1 mM tandis que sa concentration plasmatique est de l'ordre de 0,1 µM. Dans des conditions physiologiques, le NAD⁺ est stocké et utilisé dans les mitochondries à des fins métaboliques. Dans le cytoplasme et dans le noyau, le NAD⁺ remplit des fonctions de signalisation cellulaire, en tant que précurseur de métabolites mobilisateurs du calcium (comme NAADP) et en tant que substrat pour deux familles d'enzymes nucléaires, la poly-ADP-ribosylpolymérase (PARPs) et la famille des sirtuines. Cette famille de lysines déacétylases dépendantes du NAD⁺ joue un rôle important dans la coordination de la réparation de l'ADN, la régulation des niveaux de transcription et le contrôle de la progression vers l'apoptose (Burnstock and Knight 2004). Dans des conditions physiopathologiques telles que l'ischémie, le stress oxydatif ou en réponse à des agents endommageant l'ADN, les cellules libèrent leur contenu en NAD⁺ mitochondrial dans le cytoplasme et le noyau par des mécanismes encore inconnus. Le NAD⁺ semble également être libéré dans l'espace extracellulaire par des processus non lytiques dans diverses conditions physiopathologiques telles que l'hypoxie, l'inflammation et l'activation mécanique ou chimique (Bruzzone et al. 2001). Les connexines 43 permettent des flux de NAD⁺ à travers des cellules intactes. De plus, de fortes concentrations locales de NAD⁺ peuvent être libérées dans diverses situations physiologiques et physiopathologiques permettant l'ADP-ribosylation de protéines membranaires sur les cellules avoisinantes exprimant des enzymes de la classe des ADP-Ribosyl transferase (ART). Certaines formes d'ART telle que ARTC2.2 est impliquée dans la régulation immunitaire (Adriouch et al. 2008; Haag et al. 2007). Il n'est donc pas surprenant que le NAD⁺ joue un rôle essentiel dans la réponse cellulaire au stress. Le devenir des concentrations de NAD⁺ générées dans ces conditions est contrôlé par des ecto-NADases incluant CD38 et CD157.

P2X7 peut être activé par une voie indépendante à l'ATP qui a été découverte et caractérisée dans les LT murins. Ce mécanisme implique l'ecto-ADP-ribosyltransferase ARTC2.2 qui, en présence de son substrat le NAD⁺, catalyse l'ADP-ribosylation d'un résidu arginine en position 125 dans le domaine extracellulaire du récepteur P2X7 proche de la poche de liaison à l'ATP. Les ADP-ribosylations sont des modifications post-traductionnelles covalentes et peuvent activer continuellement P2X7. Cependant ce mode d'activation de P2X7 est spécifique d'une espèce, il agit sur les variants du récepteur P2X7 murin mais pas sur le récepteur humain. En effet, le gène *Art2b* codant l'ADP-ribosyl transferase

ARTC2.2 est exprimé différemment entre l'homme et la souris. Les souris ont hérité de deux copies actives de ce gène tandis que chez l'homme, la transcription du seul gène orthologue est silencieuse due à la présence de trois codons stops qui sont apparus chez les primates. De plus, ce mécanisme d'activation est connu pour fonctionner dans les LT murins mais pas dans les macrophages. Par conséquent, cet effet peut également être spécifique à un type cellulaire ou à une isoforme. La souris, contrairement à l'homme, possède deux isoformes N-terminaux du récepteur P2X7 codés par les P2X7a et P2X7k. Le récepteur codé par le variant P2X7k prédomine dans les LT et est particulièrement sensible à l'ADP-ribosylation. De ce fait, seule cette isoforme P2X7k spécifique à la souris est capable d'être stimulée par le NAD⁺. Les enzymes ADP-ribosyltransférases présentent également des profils d'expression spécifiques de tissus, ce qui contribuerait à la régulation de la signalisation de P2X7 passant par le NAD⁺. (**Figure 9**)

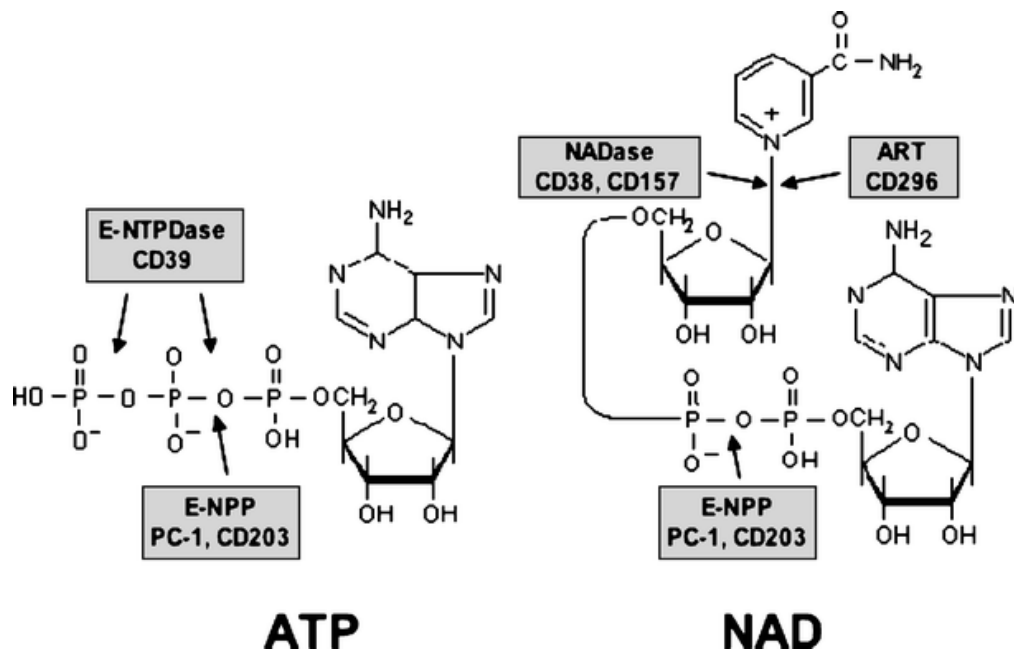


Figure 9 : Structure et site de catalyse des enzymes de l'ATP et du NAD⁺

Structure biochimique de l'ATP et du NAD⁺ ainsi que les sites catalytiques des principales enzymes les clivant. (Haag et al. 2007b)

3.3. Régulation de la concentration d'ATP extracellulaire : les ectonucléosidases

La demi-vie de l'ATPe est relativement faible du fait de son hydrolyse rapide en AMP et adénosine à la suite de l'activité combinée d'ectonucléotidases. Les ectonucléotidases sont des enzymes capables d'hydrolyser les nucléotides extracellulaires, principalement l'ATP, l'UTP et le NAD⁺, en générant des métabolites capables à leur tour de réguler les réponses physiologiques ainsi que les réponses immunitaires et inflammatoires. Elles sont exprimées à un niveau élevé par les cellules du système immunitaire, principalement à la surface des cellules et classées en quatre grandes familles :

les ectonucléosides triphosphate diphosphhydrolases (NTPDases), les nicotinamides adénine dinucléotide glycohydrolase (NAD glycohydrolase), l'ADP-rybosile cyclase/cyclique ADP-ribose hydrolase 1'-ecto-5'-nucléotidase (NT5E/CD73) et les ecto-nucléotides pyrophosphatase/phosphodiesterases (NPPs). Les NTPDases sont exprimées dans tous les tissus et hydrolysent des nucléosides triphosphates et diphosphates produisant des nucléosides monophosphates. Parmi celles-ci, la NTPDase1/CD39, la NTPDase2/CD39L1, la NTPDase3/CD39L3 et la NTPDase8/hATPDase sont exprimées à la surface des cellules, les NTPDases 4-7 sont présentes dans les organelles intracellulaires, tandis que les NTPDases 5 et 6 sont également présentes sous forme sécrétée. Les NTPDases sont très probablement les plus importantes enzymes extracellulaires hydrolysant les nucléotides. Les NTPDases exprimées sur la membrane plasmique, c'est-à-dire les NTPDases 1, 2, 3 et 8, hydrolysent à la fois les nucléosides triphosphates et diphosphates, tandis que les autres membres de la famille présentent une sélectivité de substrat plus restreinte. Ainsi l'ATP, l'UTP, l'ADP et l'UDP extracellulaires sont hydrolysés en AMP et UMP. La NTPDase1/CD39 est l'ectonucléotidase la mieux caractérisée. Elle est largement exprimée sur différents types de cellules immunitaires, tels que les monocytes, les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T régulateurs (Tregs) et les NK, ainsi que les cellules endothéliales vasculaires (Deaglio et al. 2007; Deaglio and Robson 2011). CD39 possède cinq domaines très fortement conservés dit « régions apyrases conservées » qui participent à la formation du site actif et à la catalyse des nucléotides extracellulaires. CD39 partage également des motifs de séquence communs ainsi que des similarités de structure secondaire et tertiaire avec les membres de la superfamille ASKHA (« *acetate and sugar Kinases/HSP70/Actin* »). CD39 est ancrée à la membrane cellulaire par deux domaines transmembranaires qui sont essentiels au maintien de l'activité catalytique et à la spécificité pour le substrat. CD39 subit des modifications post-traductionnelles, notamment une protéolyse et une glycosylation, cette dernière étant déterminante pour lui conférer une activité catalytique. Le domaine N-terminal intracytoplasmique subit une palmitoylation pour permettre l'association de l'enzyme avec les radeaux lipidiques. Les expériences menées pour interférer avec les niveaux de cholestérol par le biais de molécules chimiques, qui appauvrissent ou séquestrent le cholestérol membranaire, ont montré une forte inhibition de l'activité enzymatique de CD39 (Allard et al. 2017). Une activité NTPDase a été trouvée dans des microvésicules circulant dans le sang (Jiang et al. 2014). Ces microvésicules, produites et libérées par différents types cellulaires, agissent au niveau intercellulaire et permettent le transport d'enzymes, de récepteurs et de microARN de cellule à cellule. Une étude a démontré que l'activité NTPDase associée aux microvésicules atténue l'activation des cellules endothéliales en modulant l'échange de signaux régulateurs entre les leucocytes et les cellules vasculaires (Banz et al. 2008).

Un rôle clé de la signalisation purinergique est joué par CD73, l'enzyme principale produisant l'adénosine extracellulaire à partir de l'AMP. Bien que dans plusieurs tissus les phosphatases telles que les NTPDases contribuent à la conversion de l'AMP en adénosine, CD73 est l'enzyme dominante générant l'adénosine (**Figure 10**). CD73 est principalement une protéine membranaire homodimérique à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) se liant au Zn^{2+} orientée vers le compartiment extracellulaire. Cependant une forme soluble a également été décrite (Airas et al. 1997; Yegutkin, Samburski, and Jalkanen 2003). Les deux sous-unités de 70 kDa sont complexées avec les ions catalytiques dans le domaine N-terminal, héberge un site de liaison à l'AMP dans le domaine C-terminal, et présente une courte hélice alpha entre les domaines N et C terminaux. CD73 est exprimée par les cellules stromales, les DC folliculaires, les cellules endothéliales, les neutrophiles, les macrophages et par des sous-populations de LT humains (Bono et al. 2015). La forme soluble de CD73 est principalement excrétée par les cellules endothéliales et les lymphocytes. Elle est présente à la fois dans le sérum et la lymphe dans les conditions physiologiques (Yegutkin et al. 2015). Sa concentration augmente cependant dans les conditions inflammatoires (Schneider et al. 2019). CD73 hydrolyse les ribo- et les déoxyribo-nucléoside 5'-monophosphates parmi lesquels l'AMP avec une forte efficacité, et le CMP, l'UMP, l'IMP et le GMP avec une plus faible efficacité. L'ADP se lie au site catalytique de CD73 mais n'est pas hydrolysé, agissant ainsi comme un inhibiteur compétitif (Naito and Lowenstein 2002). L'ADP généré à partir de l'ATP, par les NTPDases principalement, inhibe CD73 et retarde la formation d'adénosine, favorisant ainsi l'inflammation (Vieira et al. 2014). L'hydrolyse de l'ADP extracellulaire par les ectonucléotidases est donc nécessaire pour empêcher l'inhibition de CD73.

L'ATPe est ainsi séquentiellement hydrolysée en ADP et AMP par les NTPDases (principalement CD39) ou peut être directement hydrolysée en AMP par les NPPs. L'AMP peut également être générée à partir du NAD^+ par l'activité séquentielle de CD38 et NPP1 pour être ensuite catabolisée en adénosine par CD73. En conclusion, les ectonucléotidases régulent la concentration extracellulaire d'ATP, de NAD^+ ainsi que d'autres nucléotides extracellulaire, et catabolise leur conversion en plusieurs métabolites bioactifs (Giuliani, Sarti, and Di Virgilio 2019; Boison and Yegutkin 2019). (**Figure 10**)

3.4. Dégradation du NAD^+ extracellulaire

Les enzymes qui peuvent hydrolyser le NAD^+ impliquent trois familles d'ecto-enzymes connues : i) les NAD^+ -glycohydrolases/ADP-ribose cyclases (CD38 et CD157), ii) les ecto-nucléotides pyrophosphatases / phosphodiesterases (NPPs) telles que CD203 et iii) la 5'-ecto-nucleotidase, CD73, qui pourrait dégrader directement le NAD^+ mais avec une efficacité environ vingt fois inférieure à son substrat naturel l'AMP (Garavaglia et al. 2012)(**Figure 10**). En dégradant le NAD^+ extracellulaire, ces enzymes entrent directement en compétition avec l'ADP-ribosylation catalysé par les ecto-ARTs.

CD38 est une glycoprotéine de surface exprimée par les thymocytes, les LT et les lymphocytes B activés, les plasmocytes et les DC. Son activité NAD-glycohydrolyse permet hydrolyse du NAD⁺ en ADP ribose (ADPR). Cependant CD38 possède également une activité ADP-ribose cyclase qui permet de générer de l'ADP-ribose cyclique (ADPRc). Comme elle peut être libérée sous forme soluble ou être internalisée, CD38 a probablement à la fois une fonction extracellulaire et intracellulaire. Dans l'espace intracellulaire, l'ADPRc est un messenger qui déclenche la libération de Ca²⁺ à partir des réserves intracellulaires. L'ADPR extracellulaire est au contraire convertie en adénosine par l'action combinée des NPP et de CD73. Chez la souris, CD38 est nécessaire à la migration des DC matures vers les tissus lymphoïdes secondaires et par conséquent la déficience en CD38 entraîne une altération de l'immunité contre les antigènes dépendant des LT (Wykes et al. 2004). L'activité combinée de CD38, des NPP, et CD73 semble importante pour la génération d'adénosine immunosuppressive dans les sites inflammatoires et dans l'environnement tumoral. L'hydrolyse du NAD⁺ extracellulaire affecte la réponse immunitaire de multiples façons, notamment en exerçant une activité protectrice sur les Tregs et les NK (Linden, Koch-Nolte, and Dahl 2019). En effet, en éliminant le NAD⁺ extracellulaire, CD38 inhibe l'activité de l'ARTC2.2, qui catalyse l'ADP-ribosylation du récepteur P2X7, une voie parallèle d'activation irréversible de ce récepteur conduisant à la mort cellulaire (Adriouch et al. 2007; Scheuplein et al. 2009; Schwarz et al. 2009). Les lymphocytes B qui expriment de fort niveau de CD38 rentrent alors en compétition avec l'activité de l'ARTC2.2 exprimée par les LT et limitent significativement l'ADP-ribosylation à la surface des LT dans des conditions normales (Krebs et al. 2005). Par conséquent, lorsqu'il est libéré dans l'espace extracellulaire à la suite d'un stress cellulaire, le NAD⁺ peut être utilisé par les ecto-ART pour modifier les protéines cibles de manière covalente par ADP-ribosylation ou pour être dégradé en métabolites telle que l'adénosine. L'adénosine peut ensuite stimuler les récepteurs P1 ou être convertie en inosine par l'adénosine deaminase (ADA) avant d'être internalisée dans les cellules par des transporteurs de nucléosides et finalement être recyclée par la voie de récupération des nucléotides (*nucleotide salvage pathway*) (Seman et al. 2004; Deterre et al. 1996). Par conséquent, l'effet biologique net du NAD⁺ extracellulaire dépend de la quantité de NAD⁺ libérée dans l'espace extracellulaire, de la qualité et de la quantité de récepteurs/enzymes spécifiques exprimés par les cellules environnantes et de l'activité des enzymes cataboliques (Haag et al. 2007a; Koch-Nolte and Ziegler 2013). Un tel équilibre entre la production locale d'une molécule de signalisation qui est normalement absente de l'espace extracellulaire et sa dégradation/consommation rapide est caractéristique des signaux de danger qui peuvent alerter les cellules immunitaires (**Figure 10**).

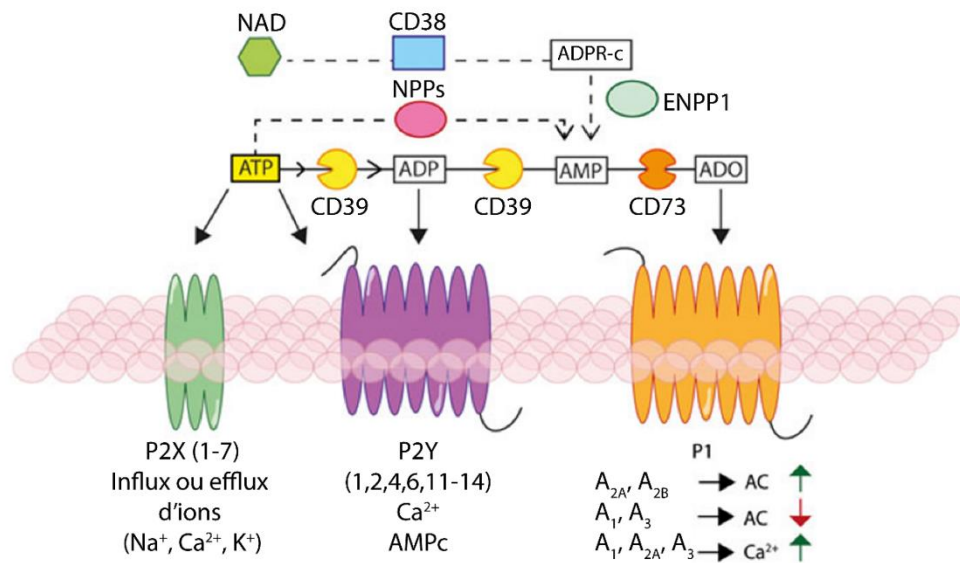


Figure 10 : Devenir de l'ATP et du NAD extracellulaire et signalisation purinergique induite par ces molécules et leurs catabolites.

Activité des ectonucléosidases présentes dans l'espace extracellulaire et dégradation de l'ATP et le NAD⁺ que la signalisation purinergiques induite par ces molécules et leurs métabolites. ADO, adénosine. D'après (Giuliani, Sarti, and Di Virgilio 2021).

4. Le récepteur P2X7, la signalisation purinergique et le système immunitaire

Au sein des récepteurs purinergiques, P2X7 semble jouer un rôle privilégié dans la régulation des réponses immunitaires. Il est en effet largement exprimé par les cellules immunitaires innées et adaptatives.

4.1. P2X7 et système immunitaire innée

Dans le contexte du système immunitaire, P2X7 est surtout connu pour son rôle dans la promotion de la formation de l'inflammasome et la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , par les cellules de l'immunité innée, telles que les macrophages, les monocytes et les DC après exposition à l'ATP et aux LPS.

4.1.1. L'inflammasome NLRP3

Les *pattern recognition receptor* (PRRs) reconnaissent la présence de composants microbiens uniques appelés les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ou *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) qui sont générés par un stress endogène et déclenchent des voies inflammatoires afin d'éliminer l'infection et permettre la réparation tissulaire. L'activation des inflammasomes, des complexes protéiques multimériques intracellulaires activant la caspase-1, est

une voie majeure de l'inflammation. Un inflammasome est définie par une protéine de détection (appartenant à la classe des PRR), qui s'oligomérisent pour former un complexe d'activation de la procaspase 1 en réponse à des DAMPS ou des PAMPs.

Des membres des PRRs ont été démontrés comme pouvant constituer des inflammasomes : le domaine d'oligomérisation se liant aux nucléotides (*nucleotide-binding oligomerization domain* NOD), les membres de la famille des protéines contenant des répétitions riches en leucine (*leucine-rich repeat (LRR)-containing proteins* NLR) NLRP1, NLRP3 et NLRC4, ainsi que l'AIM2 (*absent in melanoma*) et la pyrine. En plus de ces membres, d'autres PRRs tels que NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP12 et IFI16 ont été rapportés comme pouvant former des inflammasomes. Dans le cas de certains de ces PRRs tels que NLRP1, NLRP3, AIM2 et la pyrine, une protéine adaptatrice connue sous le nom de protéine ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*, speck-like contenant un domaine de recrutement de la caspase) facilite le recrutement de la pro-caspase 1 dans le complexe.

La caspase 1 est activée par un clivage autocatalytique à la suite de son recrutement dans le complexe que forme l'inflammasome. La caspase 1 activée clive ensuite les cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 sous leurs formes matures et biologiquement actives qui s'accumulent ainsi dans le cytoplasme et qui sont dépourvues de séquences signales permettant leur sécrétion vers l'espace extracellulaire. La caspase-1 va également cliver la GSDMD, libérant son extrémité N-terminale capable de s'oligomériser et de former des pores dans la membrane plasmique, déclenchant ainsi une forme lytique et pro-inflammatoire de mort cellulaire appelée pyroptose (Shi et al. 2015; He et al. 2015). Les pores membranaires formés par l'oligomérisation des régions N-terminales de la GSDMD ; permettent parallèlement à la mort cellulaire, la libération des formes matures d'IL-1 β et IL-18 vers le compartiment extracellulaire. La pyroptose force les pathogènes intracellulaires à sortir de leur niche de réplication, les exposant à d'autres facteurs immunitaires et déclenchant également la libération de cytokines et la génération de DAMPs afin de renforcer le système immunitaire à répondre à l'infection. L'IL-1 β induit l'expression de gènes contrôlant la fièvre, le seuil de douleur, la vasodilatation, l'hypotension. Son activation entraîne une réponse des cellules endothéliales qui facilite l'infiltration des cellules immunitaires dans les tissus infectés ou endommagés. Tandis que l'IL-18 est une cytokine co-stimulatrice intervenant dans l'immunité adaptative et est nécessaire pour la production d'IFN- γ (Dinarello 2009).

L'inflammasome NLRP3 est essentiel à la réponse immunitaire contre les bactéries, les champignons et les infections virales (Allen et al. 2009; Gross et al. 2009). NLRP3 est une protéine tripartite constituée d'un domaine pyrine amino-terminal (PYD), un domaine central de liaison aux nucléotides et d'oligomérisation (NOD, ou domaine NACHT) et d'un domaine C-terminal répété riche en leucine (LRR) C-terminal (Franchi et al. 2009). Le domaine pyrine de la protéine NLRP3 interagit avec le domaine pyrine de la protéine ASC afin d'initier l'assemblage de l'inflammasome (Vajjhala, Mirams,

and Hill 2012). Le domaine NOD possède une activité ATPase qui est nécessaire à l'oligomérisation de NLRP3 suivant son activation (Duncan et al. 2007). De plus, la protéine *never-in-mitosis A(NIMA)-related kinase 7* (NEK7) a récemment été identifiée comme un composant essentiel de l'inflammasome NLRP3 (Shi et al. 2016).

L'ATPe est un puissant activateur de l'inflammasome NLRP3. Il a été démontré que l'efflux de K^+ constituait l'une des voies permettant d'activer directement l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 β . La génération de la première souris déficiente pour P2X7 a démontré son implication dans la production de cytokines proinflammatoires et notamment de l'IL-1 β dans un modèle d'arthrite induite par le collagène (Solle et al. 2001). Cependant, alors que le récepteur P2X7 était généralement proposé comme responsable directement de l'efflux de K^+ , une étude récente a identifié un autre canal, TWIK2, appartenant à la famille des canaux potassiques K_2P (*two pore domain K^+ channel*) (Di et al. 2018). Selon cette étude, l'influx de cations induit par P2X7 génère la force motrice de l'efflux de K^+ . Cette étude démontre très clairement que l'inhibition de l'inactivation de TWIK2 dans les macrophages murins inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3, l'activation de la caspase-1 et la libération d'IL-1 β . Cependant, les mécanismes moléculaires de l'assemblage de l'inflammasome et de l'activation des caspases restent peu connus. Sur la base d'études d'immunoprécipitation et de colocalisation dans des lignées cellulaires, il a été suggéré que le récepteur P2X7 pourrait également interagir directement avec NLRP3 (Franceschini et al. 2015).

Actuellement, un modèle à deux signaux a été proposé pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 11**). Dans ce modèle, le premier signal fourni par des composants microbiens ou des cytokines endogènes amorce (« *priming* ») l'inflammasome NLRP3. Le second signal provenant de l'ATPe, de toxines formant des pores ou d'autres mécanismes, active l'inflammasome NLRP3. NLRP3 peut être en effet activé par une variété de stimuli, par des infections bactériennes, virales ou fongiques ou bien, dans le cas de l'inflammation stérile, par des DAMPs endogènes (ATP, cristaux de cholestérol ou d'acide urique) et des irritants environnementaux (amiante, cristaux de silices). Ces activateurs provoquent un stress cellulaire qui va être reconnu par NLRP3. L'activation de NLRP3 comprend de multiples signaux en amont, dont la plupart ne sont pas mutuellement exclusifs, notamment l'efflux d'ions K^+ ou Cl^- , le flux d'ions Ca^{2+} , la perturbation des lysosomes, le dysfonctionnement mitochondrial, les changements métaboliques, la production de ROS et le désassemblage du trans-Golgi. En plus de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18), l'activation de l'inflammasome conduit à la pyroptose, qui est une forme rapide et inflammatoire de mort cellulaire lytique programmée. Comme décrit précédemment, des études récentes ont identifié que la GSDMD est le médiateur de la pyroptose. (Shi et al. 2015; He et al. 2015). Sa partie N-terminale se lie aux phosphates des phosphatidylinositols et de la phosphatidylsérine dans le feuillet interne de la membrane cellulaire. Elle s'y oligomérisé formant un pore de 10 à 14 nm contenant 16 protomères

symétriques (Ding et al. 2016), détruisant ainsi les cellules de l'intérieur. De plus, la GSDMD^{Nterm} démontre une activité bactéricide *in vitro* en se liant à la cardiolipine présente dans les membranes bactériennes externes et internes (Liu et al. 2016). Ensemble, ces résultats révèlent que la GSDMD détermine biochimiquement la pyroptose en aval de l'activation de l'inflammasome.

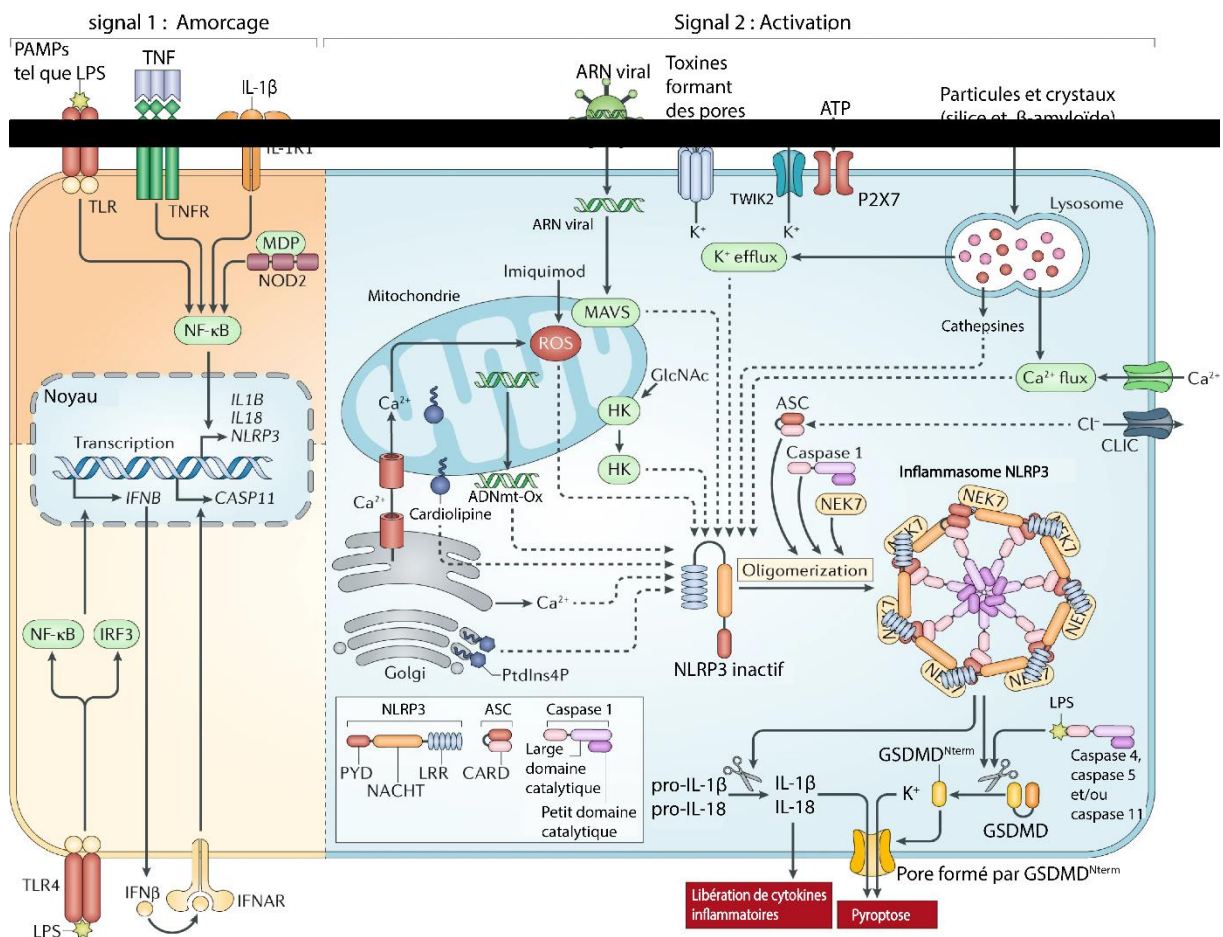


Figure 11 : Modèle à deux signaux de l'inflammasome

Le signal 1 permet l'amorçage ou « *priming* » de l'inflammasome par un stress cellulaire lié à une infection bactérienne, virale ou fongique ou des DAMPs endogènes. Il conduit à la transcription des gènes codants pour les formes inactives de l'IL-1β et de l'IL-18 ainsi que les protéines NLRP3 et les caspases proinflammatoires. Le signal 2 permet l'activation de l'inflammasome par l'oligomérisation de NLRP3 et entraîne l'activation de la caspase-1, la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi que le clivage de la GSDMD conduisant à la mort cellulaire lytique inflammatoire, la pyroptose. D'après (Swanson, Deng, and Ting 2019).

4.1.2. Le récepteur P2X7 sur les cellules dendritiques

Les DC sont spécialisées dans la présentation d'antigènes qui activent efficacement les LT naïfs. Ces cellules expriment le récepteur P2X7 et répondent à l'ATP libérée lors de lésions tissulaires. Le rôle le plus connu de l'activation de P2X7 sur les DC est la production d'IL-1β à travers l'assemblage de l'inflammasome.

Les signaux de danger tels que l'ATP peuvent stimuler la migration des DC dans les ganglions drainants, où elles activent les lymphocytes naïfs et promeuvent ainsi la réponse immunitaire (Banchereau and Steinman 1998). Il a été suggéré que la signalisation passant par la pannexine-1 et le récepteur P2X7 était responsable de la migration rapide et dépendante de l'ATP des DC (Saéz et al. 2017). La maturation des DC implique l'augmentation de l'expression en surface des molécules de costimulation telles que CD80, CD86, CD40 et des molécules de CMH (Mutini et al. 1999; Killeen et al. 2013). L'ajout exogène d'ATP (10 μ M) induit l'expression de CD80 et CD86 dans les DC dérivées de la moelle osseuse, ce qui entraîne une activation efficace des LT CD4⁺. De plus, la déplétion *in vivo* de l'ATP activant P2X7 par l'apyrase réduit l'expression de CD80 et CD86 dans les cellules CD11c⁺ des ganglions lymphatiques dans un modèle murin de maladie aiguë du greffon contre l'hôte (Wilhelm et al. 2010).

De plus, P2X7 joue un rôle dans la sécrétion des cytokines par les DC et la polarisation des LT *helper* (Th1 et Th17). Bien qu'il existe des preuves d'un possible rôle de l'ATP sur les DC réduisant les réponses Th1 *in vitro*, il existe peu d'études confirmant les effets spécifiques de P2X7 sur les DC au cours de la différenciation des Th1. *In vitro*, des expériences ont montré que des DC stimulées avec des concentrations micromolaires (supérieure à 10 μ M) d'ATP non hydrolysable, l'ATP γ S, inhibaient la production et la sécrétion d'IL-12 et de TNF- α (Sala et al. 2001). Dans le même sens, des DC prétraitées à l'ATP altèrent la polarisation Th1 lorsqu'elles ont été mises en coculture avec des LT CD4⁺ naïfs (Sala et al. 2001). Cependant, le rôle de l'inhibition de P2X7 sur la production d'IL-12 par les DC est encore débattu, puisque d'autres études ont également indiqué que le récepteur P2Y11 pourrait médier cet effet à travers la signalisation passant par l'AMPc (Schnurr et al. 2005; Fran et al. 2002). D'autre part, l'ATP peut non seulement réduire la différenciation des lymphocytes Th1 mais aussi diminuer l'interaction des DC avec les LT. Le traitement des DC avec des concentrations micromolaires d'ATP réduit leur capacité à attirer les LT Th1. Il a été démontré que les surnageants obtenus à partir des DC traitées à l'ATP diminuent la capacité migratoire de ces lymphocytes (La Sala et al. 2002).

L'activation de P2X7 par l'ATP a été décrite comme modulant la polarisation Th17 dans différents tissus et modèles (Sharp et al. 2008; Vergani et al. 2013; Vergani et al. 2013; Zhao et al. 2013). Des études dans des modèles de transplantation cardiaque et d'îlots pancréatiques chez la souris montre que l'utilisation d'un antagoniste de P2X7 induit une diminution de la différenciation Th17 et ont des effets bénéfiques dans la transplantation (Vergani et al. 2013). L'effet de l'activation de P2X7 sur la différenciation des cellules Th17 a également été étudié dans les maladies auto-immunes. Des études sur des souris lupiques, où P2X7 est surexprimé comparé aux souris témoins, montrent une augmentation de l'expression rénale de NLRP3, ASC et de la forme active de la caspase-1, corrélée avec des taux sériques et rénaux d'IL-1 β plus élevés. Dans cette étude, l'inhibition de P2X7

par un antagoniste (Brillant Blue G, BBG) ou un ARNsi permettait de diminuer les taux d'IL-1 β et la fréquence des LT Th17 dans la rate et le sang (Zhao et al. 2013). Une étude de Atarashi et collaborateurs a pu mettre en évidence le rôle direct de l'activation de P2X7 sur les DC conduisant à la polarisation Th17. En effet, la stimulation avec un analogue de l'ATP, l'ATP γ S a permis d'induire l'expression d'IL-6 et d'IL-23 dans un sous-groupe de DC de la lamina propria exprimant P2X7, permettant alors l'augmentation des réponses Th17 (Atarashi et al. 2008). De plus, il a été décrit que la stimulation de P2X7 par l'ATP sur les DC active l'inflammasome et promeut la différenciation des cellules Th17 dans un modèle d'asthme murin induit par l'ovalbumine (Li et al. 2018). Le rôle de l'inflammasome dans ce contexte a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs de la caspase-1 et de NLRP3 dans les DC, les deux inhibant la différenciation des cellules Th17. Ces études suggèrent que l'activation de P2X7 dans les DC jouent un rôle dans l'induction des réponses des cellules Th17 en générant un microenvironnement cytokinique favorisant leur différenciation.

4.2. P2X7 et système immunitaire adaptatif

4.2.1. Rôle de P2X7 dans l'activation des LT

La signalisation purinergique au niveau de la synapse immunitaire joue un rôle essentiel dans l'amplification de la signalisation passant par le récepteur des cellules T (TCR). Suite à la reconnaissance antigénique, la transduction du signal passant par le TCR et les molécules de costimulation induit la libération rapide d'ATP à des concentrations micromolaires par les LT à travers les canaux de la pannexine-1 (Junger 2011; Woehrle et al. 2010; Yip et al. 2009b). L'ATP libérée au niveau de la synapse immunitaire active de manière autocrine les récepteurs P2X, notamment les récepteurs P2X1, P2X4 et P2X7 (Schenk et al. 2008). Cette activation entraîne un influx de Ca²⁺, la production d'IL-2 et la prolifération par l'activation du facteur de transcription NFAT ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène *p2rx7* (Yip et al. 2009b). Après activation, les récepteurs P2X1 et P2X4 sont rapidement recrutés dans la synapse immunitaire tandis que le récepteur P2X7 est uniformément distribué à la surface cellulaire, tourné vers l'ATP environnant. Le rôle de P2X7 dans l'influx de calcium et la signalisation en aval nécessaire à l'activation des LT a été reporté sur des LT CD4⁺ humains dans une étude de Junger et collaborateurs. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'inhibition de P2X7 par différentes stratégies entraîne un blocage de l'influx calcique et une inhibition de l'activation des LT. Cela suggère que la combinaison avec les signaux générés à la synapse immunitaire et l'activation de P2X7 par l'ATP est nécessaire pour une activation complète et prolifération des LT (Yip et al. 2009b).

4.2.2. Sensibilité différentielle des LT à la mort cellulaire induite par l'ATP et le NAD⁺

P2X7 a également été identifié comme un important régulateur de la fonction des LT murins. L'ATP et le NAD⁺ intracellulaires sont considérés comme des sources d'énergie essentielles. Cependant, pendant les processus inflammatoires et les lésions tissulaires ces deux nucléotides sont relargués dans l'espace extracellulaire. Ils peuvent alors activer P2X7 ce qui peut induire leur mort cellulaire selon le temps d'incubation, la dose et le type cellulaire. Les récepteurs P2X7 des LT murins peuvent être activés d'une part par l'ATP extracellulaire et d'autre part par le NAD⁺ comme il a été mentionné précédemment (Seman et al. 2003; Adriouch et al. 2008). L'activation de P2X7 par son ADP-ribosylation fournit un signal d'activation durable, même après une brève exposition à des concentrations relativement faibles de NAD⁺ (c'est-à-dire 1 à 30 μ M) (Schwarz et al. 2009). Au contraire, l'activation de P2X7 par l'ATP nécessite sa présence continue dans le milieu extracellulaire à des concentrations suffisantes (de l'ordre de 100 μ M) (Scheuplein et al. 2009). Cette ADP-ribosylation du récepteur P2X7 entraîne ainsi inévitablement une activation chronique conduisant alors à la mort cellulaire (Seman et al. 2003). Ce processus est connu comme la mort cellulaire induite par le NAD⁺ (NICD) et s'effectue par deux voies, l'une dépendante de la formation du macropore et la seconde impliquant la phosphorylation de ERK1/2 (Tsukimoto et al. 2006). L'activation prolongée de P2X7 permet la formation de macropores dont la formation implique la queue C-terminale de P2X7 (Surprenant et al. 1996; Adinolfi et al. 2010). La formation de ces macropores cause un flux d'ions associé à une modification de la taille des cellules et à la translocation des phosphatidylsérines (Taylor et al. 2008; Tsukimoto et al. 2005). Une étude menée par Elliot et collaborateurs a constaté que l'activation de P2X7 est rapidement suivie d'un gonflement cellulaire des lymphocytes qui se termine finalement par une lyse cellulaire. Cette observation suggère que l'activation de P2X7 peut induire une nouvelle voie de mort cellulaire qui ne correspond pas à la voie canonique de l'apoptose (Taylor et al. 2008).

D'autre part, la mort cellulaire induite par P2X7 a été observée indépendamment de la formation des pores et de l'influx de calcium. Cette voie alterne nécessite la phosphorylation de la protéine kinase ERK1/2 (Tsukimoto et al. 2005; Auger et al. 2005). Bien que dans d'autres types cellulaires l'extrémité N-terminale de P2X7 soit importante pour l'activation de ERK1/2 (Amstrup and Novak 2003b), les mécanismes d'action de cette voie de signalisation sur les LT n'ont pas encore été clarifiés.

L'expression de P2X7 sur les LT murins dépend du stade de maturation et de différenciation. La mort cellulaire peut être induite dans une fraction de thymocytes par l'ATPe, suggérant que l'expression du gène *P2rx7* est induite dans les LT durant leur différenciation dans le thymus. Il a été

suggéré que l'ATP joue un rôle dans la mort des thymocytes par délétion et dans la différenciation thymique des LT $\gamma\delta$. Les thymocytes CD4⁺ et CD8⁺ simples positifs expriment un plus fort niveau d'expression de surface de P2X7 que les thymocytes moins différenciés doubles positifs, suggérant que l'expression de P2X7 corrèle avec la maturation des LT. De plus, les LT périphériques sont plus sensibles à l'ATPe et au NAD⁺ que les thymocytes. Sur les LT matures périphériques, les LT CD4⁺ présentent des niveaux de surface de P2X7 légèrement supérieurs à ceux des LT CD8⁺, ce qui pourrait expliquer en partie leur plus grande sensibilité à l'ATPe et au NAD⁺. L'expression de P2X7 semble également être régulée par l'état d'activation des LT. En effet, les LT exprimant des marqueurs d'activation présentent des niveaux d'expression moins élevés que les LT naïfs. De même, les LT récemment activés présentent un niveau plus faible de l'ARTC2.2, en raison de son élimination de la surface cellulaire par les métalloprotéases, conférant ainsi à ces cellules une insensibilité au NAD⁺.

4.2.3. Rôle de P2X7 dans la réponse des lymphocytes T naïfs

Chez les LT, l'augmentation de Ca²⁺ cytoplasmique après stimulation du TCR par le complexe CMH/peptide est accompagnée d'une recapture mitochondriale de Ca²⁺. Cette recapture stimule la synthèse aérobie d'ATP (Hajnóczky et al. 1995; Jouaville et al. 1999). L'activation des LT naïfs entraîne également la libération d'ATP *via* les héli-canaux de la pannexine-1 et la stimulation autocrine des récepteurs P2X présents sur la membrane plasmique. Il a été montré que les LT CD4⁺ murins exprimaient les transcrits correspondant à l'expression de *P2rx1*, *P2rx4* et plus fortement de *P2rx7*. L'ATP libérée lors de l'activation des LT naïfs fonctionne alors comme un stimulus autocrine et soutient la signalisation MAPK. L'inhibition pharmacologique des récepteurs P2X promeut l'anergie des LT et montre des effets bénéfiques dans les maladies auto-immunes (Schenk et al. 2008). Ces effets sont favorisés par la conversion des LT CD4⁺ naïfs en Tregs (Schenk et al. 2011). Il a également été démontré que la signalisation autocrine par l'ATP extracellulaire *via* le récepteur P2X7 contribue à l'influx de Ca²⁺ médié par le TCR, à l'activation de NFAT, et à la production d'IL-2 dans les LT CD4⁺ humains. Le blocage de la signalisation de P2X7 inhibe l'activation des LT, ce qui suggère que le récepteur P2X7 est nécessaire pour une activation efficace des LT (Yip et al. 2009b). Il est important de noter que l'expression de CD39 et CD73, les ecto-5'-nucleotidases qui dégradent l'AMP extracellulaire en adénosine, par d'autres cellules immunitaires et résidentes des tissus peut conditionner de façon importante l'issue des réponses lymphocytaires. Notamment en participant à la stabilité des Tregs et à leur rôle immunosuppresseur (Deaglio et al. 2007; Borsellino et al. 2007; Takenaka et al. 2016). P2X7 semble jouer des fonctions différentes dans la régulation de la prolifération des cellules naïves et des cellules effectrices mémoires lors de la stimulation du TCR. En effet, des LT CD4⁺ naïfs déficients pour P2X7 ne présentent aucune différence en termes de prolifération cellulaire par rapport aux LT sauvages. Ceci suggère que P2X1 et/ou P2X4 pourraient compenser la perte d'activité de P2X7, une

observation également faite pour les LT humains (Woehrle et al. 2010). Au contraire, la stimulation des LT effecteurs mémoires déficients pour P2X7 a montré une augmentation du cycle cellulaire par rapport aux LT sauvages. Ce phénomène pourrait être dû à la production de ROS mitochondriales, associée à l'activité de P2X7 dans les LT, et à l'induction d'une sénescence cellulaire prématurée (Foster et al. 2013).

4.2.4. Activité du récepteur P2X7 dans la fonction des LT effecteurs et mémoires

L'ATPe est normalement absente au sein des tissus en conditions physiologiques à l'exception de l'intestin où l'ATPe générée par le microbiote peut pénétrer les entérocytes (Proietti et al. 2019). Au contraire, les tissus endommagés et/ou inflammatoires ainsi que le microenvironnement tumoral sont caractérisés par des concentrations d'ATPe pouvant atteindre le millimolaire (Pellegatti et al. 2008; Weber et al. 2010; Wilhelm et al. 2010). Par conséquent, l'expression de P2X7 peut avoir un impact important sur le résultat de la réponse immunitaire locale. Il a été montré que la stimulation de P2X7 sur les Tregs activés peut conduire à leur conversion en cellule pro-inflammatoire sécrétant de l'IL-17, ce qui peut aggraver les lésions inflammatoires des tissus dans des conditions pathologiques. De même, l'inhibition des récepteurs P2X7 favorise la survie à long terme des souris ayant reçu une allogreffe cardiaque en réduisant l'activation des LT et la différenciation en Th1/Th17 (Vergani et al. 2013).

Chez les LT folliculaires helper (Tfh), la stimulation de P2X7 limite l'expansion de cellules aberrantes et la génération d'anticorps autoréactifs dans le lupus murin expérimental. P2X7 contrôle probablement le développement de Tfh ICOS⁺ pathogènes sécrétant de l'IFN- γ , qui caractérise le lupus érythémateux systémique. Les patients atteints de lupus érythémateux systémique sont caractérisés par des Tfh circulants présentant une activité réduite de P2X7 (Faliti et al. 2019). Une stimulation aiguë du TCR des Tfh diminue fortement l'expression de *p2rx7*, protégeant ainsi de la mort cellulaire les LT spécifiques de l'antigène (Proietti et al. 2014). Des résultats similaires ont été obtenus chez les LT CD4⁺ résidents mémoires, suggérant que l'inhibition du gène *p2rx7* dans les LT spécifiques de l'antigène favoriserait la prolifération des cellules qui sont spécifiques des pathogènes pendant les infections (Stark et al. 2018). Cependant, dans les conditions non inflammatoires, notons toutefois que l'activité de P2X7 est nécessaire pour l'homéostasie et le maintien de LT CD8⁺ centraux à longue durée de vie et résidents mémoires chez la souris. Cela reflète probablement la stimulation tonique de P2X7 et ses conséquences sur l'activité mitochondriale et sur l'activité métabolique (Borges da Silva et al. 2018).

4.2.5. Fonction du récepteur P2X7 sur les LT CD8⁺

L'ATPe affecte la différenciation et la survie des LT activés et influence la génération et la fonctionnalité des LT CD8⁺ mémoires. Dans un modèle murin d'infection aiguë par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), le transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques du LCMV, déficients ou non pour P2X7, a mis en évidence une importante diminution de lymphocytes centraux mémoires lorsque ces LT CD8⁺ étaient déficients pour P2X7. Une étude de Borges da Silva démontre *in vivo* et *in vitro*, un rôle significatif de P2X7 dans le programme métabolique, la survie et la fonction des LT CD8⁺ mémoires notamment pour les LT CD8⁺ centraux à longue durée de vie et les LT résidents mémoires. Cependant, P2X7 ne semble pas nécessaire à la survie et la fonction des LT CD8⁺ effecteurs à courte durée de vie. Ainsi dans les LT non déficients pour P2X7, ces données suggèrent que la stimulation tonique de P2X7 participe à stimuler l'activité de l'AMPK, comme pour être sensible à l'influx calcique. De plus, l'activation de l'AMPK inhibe l'activité de mTOR, ce qui favorise la différenciation des LT CD8⁺ vers un phénotype mémoire. Une étude plus récente du groupe de Borges da Silva a démontré que dans les LT, le TGF- β induit un programme transcriptionnel conduisant les LT CD8⁺ infiltrant les tissus à devenir des LT résidents mémoires (Trm) et favorise la présence des Trm exprimant CD103 dans les tissus épithéliaux. P2X7 semble participer à cette différenciation en augmentant l'expression de CD69 et CD103 et le recrutement des Trm dans les tissus non lymphoïdes. Cette étude suggère un lien entre P2X7 et la différenciation des Trm CD8⁺, possiblement lié également au TGF- β et aux fonctions mitochondriales (Borges da Silva et al. 2020). Une étude a également démontré qu'une sous-population de LT CD8⁺ mémoires à longue durée de vie pouvait être réfractaire à l'effet d'une forte concentration en ATP malgré des niveaux d'expression de P2X7 similaires aux autres populations de LT CD8⁺ (Krummey et al. 2020). Bien que ces LT CD8⁺ mémoires à longue durée de vie semblent insensibles à l'ATP sur les critères fonctionnels de la perte de CD62L, de la formation du macropore et de la mort cellulaire, de plus faibles concentrations d'ATP pourraient avoir un effet bénéfique sur leur maintien à long terme. Il a été proposé qu'une boucle de rétroaction positive entre P2X7 et la pannexine-1 dans les LT mémoires maintient un efflux constant d'ATP intracellulaire qui pourrait favoriser leur survie à long terme, notamment à travers la signalisation passant par l'activité de l'AMPK (Wanhainen, Jameson, and Borges 2019). Ainsi, P2X7 semble essentiel pour la différenciation en LT mémoires à longue durée de vie. Il module leur capacité métabolique et régule les niveaux intracellulaires d'ATP et de Ca²⁺ qui influencent alors l'activité de l'AMPK et régulent l'homéostasie des LT mémoires.

4.2.6. P2X7 et lymphocytes T régulateurs

Les Tregs sont caractérisés par l'expression d'un facteur de transcription clef, *forkhead box P3* (FoxP3), qui est nécessaire pour leur développement, leur maintien et leurs fonctions. Le principal rôle

des Tregs est le maintien de la tolérance périphérique et la prévention de l'autoimmunité des maladies inflammatoires chroniques à travers de nombreux mécanismes impliquant des contacts cellules-cellules, la déplétion locale de l'IL-2, et la libération de facteurs inhibiteurs solubles.

Comme il a été mentionné précédemment, sur les Tregs, une exposition prolongée à l'ATP ou une exposition brève au NAD⁺ entraîne la formation du macropore, le bourgeonnement de la membrane et finalement à la mort cellulaire (Seman et al. 2003; Hubert et al. 2010). Ils ont également une sensibilité plus forte à l'ATP.

L'effet de l'ATP sur la fonction des LT est dépendant de sa concentration et du stade d'activation ou de différenciation des lymphocytes. Trabanelli et collaborateurs ont montré que l'ATP physiologique à de faibles concentrations ne modulait pas la prolifération ou la mort cellulaire des Tregs humains activés *in vitro* par des anticorps anti-CD3 et anti-CD8 (Trabanelli et al. 2012). De hautes concentrations d'ATP de l'ordre du millimolaire, qui semblent *in vitro* activer ces Tregs et renforcer leur prolifération, adhésion, migration et leurs fonctions immunosuppressives. Cependant, dans cette étude ces effets étaient en partie dues à l'activation du récepteur P2Y2 et à la dégradation rapide de l'ATP par CD39 et sa transformation en adénosine par CD73. Il a été démontré que de hautes concentrations d'ATP telles que celles trouvées dans les lésions tissulaires induisait l'activation de P2X7 et pouvaient affecter la stabilité et la survie des Tregs non activés exprimant plus faiblement CD39 que les Tregs activés. De plus, l'activation de P2X7 en présence de l'IL-6, une cytokine proinflammatoire, augmente la synthèse d'ATP et la phosphorylation de ERK dans les Tregs à travers une activation autocrine de P2X7. Tout cela se traduit par une altération de la fonction suppressive et de la stabilité des Tregs induisant leur différenciation en LT Th17.

Un autre type de Tregs, les Tr1, sont caractérisés par la production d'IL-10 et l'absence d'expression de FoxP3. L'équipe de Quitana a démontré un contrôle de la différenciation des Tr1 par la signalisation purinergique. Dans cette étude, l'activation de P2X7 par l'ATP inhibait la différenciation en Tr1, et une augmentation de la fréquence de cette sous-population dans les souris déficientes pour P2X7. L'expression de CD39, permettant la déplétion de l'ATP, semblait nécessaire à la production d'IL-10 par les Tr1 (Mascanfroni et al. 2015). Une autre étude a également démontré que les Th17 exprimant fortement CD39, présentent une plasticité phénotypique leur permettant une différenciation en Tr1 dans un modèle de colite expérimentale (Robles et al. 2020). De plus, les Th17 différenciés en présence de TGF- β 1 expriment à haut niveau CD39 et produisent de l'IL-10. Ces cellules expriment une forme active de CD39 et semblent moins sensibles à la mort cellulaire induite par l'ATP que les autres Th17. De plus la production d'IL-10 et la différenciation des Tr1 est amplifiée par l'absence

de P2X7, ce qui suggère que la déplétion de l'ATP médiée par CD39 permet aux Th17 de se différencier en Tr1 (Fernández et al. 2016).

II- Rôle du récepteur P2X7 dans l'inflammation et le cancer

1. Le récepteur P2X7 dans les maladies inflammatoires

1.1. P2X7 dans les maladies neurodégénératives et psychiatriques

Des données de plus en plus nombreuses montrent que les récepteurs P2 jouent un rôle important dans une variété de troubles neurologiques, tels que la sclérose en plaques (SEP), la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique. Des données récentes ont permis de mettre en évidence l'intérêt des récepteurs P2Y1 et P2X7 en tant qu'acteurs possibles de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Reichenbach et al. 2018; Martin et al. 2018). L'antagoniste de P2X7 « GSK1482160 » a été proposé pour le traitement de la tauopathie à un stade précoce (Ruan et al. 2020). P2Y6 et P2X7 sont également impliqués dans la sclérose latérale amyotrophique mais les données sont controversées et on ignore encore à ce stade si l'inhibition ou la stimulation de P2X7 serait bénéfique (Apolloni et al. 2021). Dans une étude récente, l'activation de l'inflammasome P2X7/NLRP3 a été liée au développement de la maladie de Parkinson (Solini et al. 2021), ce qui suggère que les antagonistes de P2X7 pourraient être bénéfiques. Les troubles de l'humeur constituent probablement le champ d'application le plus prometteur des médicaments ciblant le récepteur P2X7 jusqu'à présent. Des données précliniques et des études d'association génétiques (Grigoriu-Serbanescu et al. 2009) suggèrent que la réduction fonctionnelle de P2X7 est très efficace dans des modèles animaux de neuroinflammation et d'anhédonie, ouvrant la voie à une application clinique des inhibiteurs de P2X7 dans le traitement de la dépression (Bhattacharya et al. 2018). L'antagoniste de P2X7 « JNJ-54175446 » fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2 pour le traitement des troubles dépressifs (clinicaltrial.gov, NCT04116606). L'inhibition de P2X7 pourrait être bénéfique dans d'autres pathologies du système nerveux tels que l'autisme (Horváth et al. 2019) et l'épilepsie (Beamer, Fischer, and Engel 2017).

L'ATPe et les autres nucléotides sont aussi de puissants régulateurs de l'activité des neurones et des cellules gliales dans la voie de la douleur. Des études ont démontré le rôle crucial de P2X3, P2X2/P2X3, P2X4 et P2X7 dans la douleur neuropathique (Inoue and Tsuda 2021). Les récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12 et P2Y13 sont aussi impliqués, des études précliniques ont mis en évidence que l'inhibition de l'un de ces récepteurs atténue la douleur neuropathique dans diverses pathologies (Zhang and Li 2019).

1.2. La signalisation purinergique dans l'inflammation

La signalisation purinergique est activement explorée pour le traitement des maladies des voies respiratoires. On constate une augmentation de la concentration d'ATP dans les voies respiratoires des patients asthmatiques ou des souris souffrant d'asthme induit expérimentalement. Plusieurs récepteurs P2 seraient impliqués, notamment P2Y1, P2Y6, P2X1 et P2X7 (Idzko et al. 2007). Dans un modèle expérimental qui reproduit un bon nombre des signes du syndrome respiratoire aiguë humain, le modèle pulmonaire aiguë (*acute lung injury* ALI) causé par l'inhalation de LPS, un rôle pathogène de l'ATPe et de P2X7 a été identifié plaidant en faveur de l'utilisation thérapeutique des antagonistes de P2X7 (Cicko et al. 2018).

Les récepteurs P2X7 et certains P2Y comme P2Y1 et P2Y2 sont aussi impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (Furini et al. 2019). Dans cette pathologie, on observe une diminution de l'expression de P2X7 sur les LT helper folliculaires qui semble impliquée dans la production d'anticorps autoréactifs, et dans l'atteinte du tissu hôte (Faliti et al. 2019). P2X7 a également fait l'objet de nombreuses recherches en tant que cible thérapeutique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, de l'arthrose et de la maladie de Crohn (Arulkumaran, Unwin, and Tam 2011a). En effet, l'inactivation génétique de P2X7 a permis de mettre en évidence son rôle majeur dans l'inflammation stérile. Les animaux déficients pour P2X7 ont des réponses inflammatoires plus faibles dans divers modèles expérimentaux d'inflammation stérile, incluant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Matute et al. 2007) et la colite expérimentale (Hofman et al. 2015).

Dans les maladies rénales, P2X7 joue également un rôle important. Taylor et collaborateurs ont mis en évidence un rôle pathogène de P2X7 dans un modèle de glomérulonéphrite expérimentale chez le rongeur. Ils ont confirmé que P2X7 est normalement exprimé à un faible niveau dans le rein de rat et de souris. Dans le modèle murin de néphrite néphrotoxique accélérée, une expression plus importante du récepteur a été démontrée associée à une augmentation des cellules apoptotiques glomérulaires. Dans un modèle de glomérulonéphrite induit par des anticorps, l'apparition de l'expression glomérulaire de P2X7 coïncidait avec l'apparition de la protéinurie (Turner et al. 2007). La même équipe a également démontré que les souris déficientes pour P2X7 étaient significativement protégées contre cette glomérulonéphrite (Taylor, Turner, et al. 2009). Ces souris déficientes pour P2X7, exposées à un sérum néphrotoxique, présentent une diminution de l'infiltration des macrophages glomérulaires, du dépôt de fibrine, de la thrombose glomérulaire, une réduction de la protéinurie, et une protection de la fonction rénale globale par rapport aux souris sauvages. De plus, le traitement par un antagoniste sélectif de P2X7, A438079, a également réduit l'expression glomérulaire de CCL2, le nombre de macrophages glomérulaires, la sévérité des lésions glomérulaires

et la protéinurie. Ces données fournissent des preuves du rôle pathogène de P2X7 dans les glomérulonéphrites inflammatoires, ainsi que du rôle thérapeutique possible d'un antagoniste sélectif de P2X7 de ces pathologies.

Dans les maladies métaboliques, des études récentes mettent en évidence l'implication des nucléotides extracellulaires et de la signalisation passant par les récepteurs P2 dans la physiopathologie de l'obésité et de l'inflammation qui est associée. En effet, l'expression du récepteur P2X7 est augmentée dans le tissu adipeux des personnes atteintes de syndrome métabolique. De plus, la déficience pour P2X7 atténue l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose hépatique induits par un régime riche en graisses (Blasetti Fantauzzi et al. 2017). P2X7 semble également jouer un rôle important dans le diabète. En effet, on observe que l'hyperglycémie entraîne une libération accrue d'ATPe par les îlots de Langerhans humains et murins et que le blocage de P2X7 retarde l'apparition du diabète chez les souris NOD et prévient les complications microvasculaires de l'hyperglycémie. P2X7 semble donc être une cible intéressante pour le traitement du diabète (Solini and Novak 2019).

1.2.1. P2X7 et Infection

P2X7 est le récepteur P2 le plus fréquemment évoqué dans la régulation de l'inflammation et de l'immunité. Étant exprimé par toutes les cellules immunitaires innées et adaptatives, il a un rôle fondamental dans le contrôle des infections bactériennes (*e.g. Mycobacterium tuberculosis*, *Porphyromonas gingivalis*), virales (*e.g. VIH*) et parasitaires (*e.g. Trichomonas vaginalis*) (Di Virgilio et al. 2017). En particulier, la participation possible de P2X7 dans la défense de l'hôte contre *Mycobacterium tuberculosis* suscite un intérêt de longue date, en raison de l'augmentation de la destruction intracellulaire de *Mycobacterium* par les macrophages après stimulation de P2X7 (Soares-Bezerra et al. 2015; Lammas et al. 1997a). Toutefois, il y a une difficulté à moduler l'activation de P2X7 à un niveau suffisant pour favoriser la destruction intracellulaire de *Mycobacterium* sans provoquer en même temps une mort cellulaire et des lésions tissulaires importantes chez l'hôte, en raison de la cytotoxicité bien connue dépendante de P2X7. Des expériences récentes suggèrent un moyen de contourner ce problème, puisque l'activation contrôlée de P2X7 peut être obtenue dans les sites inflammatoires par l'administration de modulateurs allostériques positifs de P2X7. Cette approche exploite la concentration plus élevée d'ATPe des tissus inflammés, qui permet une activation efficace et surtout, sélective de P2X7 par les modulateurs allostériques. Cette stratégie s'est avérée efficace dans un modèle de tuberculose chez le poisson zèbre (Matty et al. 2019).

P2X7 pourrait également être une cible contre l'hyperinflammation liée au SARS-CoV2. En effet, son blocage inhibe la libération de multiples facteurs telles que des cytokines proinflammatoires responsables du syndrome thrombo-inflammatoire typique du SARS-CoV2 (Di Virgilio et al. 2020).

2. Le récepteur P2X7 dans le cancer

2.1. Généralités

Le TME est un environnement dynamique et le site privilégié où les tumeurs sont en contact étroit avec les cellules de l'hôte. La composition biochimique et cellulaire du TME est d'une importance capitale pour la régulation du métabolisme, de la prolifération, de la motilité et de la dissémination des cellules tumorales. Le TME peut à la fois fournir une réponse immunitaire antitumorale protectrice ou constituer un milieu immunosuppresseur qui facilite la croissance de la tumeur. La composition biochimique du TME est le résultat de l'activité de la tumeur et des cellules stromales. Les cellules tumorales libèrent des métabolites acidifiant le TME, des enzymes dégradant la matrice extracellulaire et des molécules signalant une lésion ou un stress (DAMPs). Ces molécules recrutent et activent les cellules stromales et régulent les cellules immunitaires infiltrantes. De même, les cellules stromales libèrent des cytokines, des facteurs de croissance, des molécules cytotoxiques, des protéases et des DAMPs qui s'accumulent dans le TME et influent sur les fonctions des cellules tumorales mais aussi sur la capacité à combattre la tumeur. Les nucléotides, principalement l'ATP, sont également libérés dans le TME par les cellules tumorales et par les cellules stromales. Les effets des nucléotides dans le TME sont multiples car ils affectent la migration et l'activation des cellules immunitaires ainsi que la croissance et le métabolisme des cellules tumorales et stromales. Pour ajouter à la complexité, les nucléotides peuvent entraîner soit une stimulation immunitaire soit une immunosuppression par exemple en orientant les LT CD4⁺ vers la polarisation Th2, en fonction de la concentration des récepteurs P2 engagés. De même, les nucléotides peuvent avoir des effets diamétralement opposés sur les cellules tumorales, soit en favorisant la croissance, soit en précipitant la mort cellulaire (Di Virgilio et al. 2018). L'ATP occupe une position clef dans la configuration globale du TME. D'une part, l'ATP intracellulaire est indispensable à la survie de chaque composant cellulaire du TME et à l'exécution de ses fonctions (y compris la prolifération, pour les cellules immunitaires et malignes) (Leone and Powell 2020). D'autre part, le pool d'ATP qui accède au TME lors de la sécrétion active par les cellules vivantes ou mourantes dans l'espace extracellulaire constitue un signal majeur (Di Virgilio, Giuliani, et al. 2018). Les effets de l'ATPe dans le TME dépendent du répertoire des récepteurs P2 et des enzymes dégradant l'ATP, les ectonucléotidases exprimés par les cellules tumorales, les cellules stromales et les cellules immunitaires. Il est en effet bien connu que la signalisation purinergique (notamment ATP, adénosine, récepteurs P1 et récepteurs P2) entretient un lien étroit avec le cancer. Le TME est riche en ATP et plusieurs types de récepteurs P2 sont impliqués dans la régulation de la croissance tumorale, notamment les récepteurs P2X5, P2X7, P2Y1, P2Y2 et PY11.

2.2. Rôle de la signalisation purinergique dans le microenvironnement tumoral

Parmi les récepteurs P2, le rôle du récepteur P2X7 a été largement étudié dans plusieurs types de cancer. L'activation du récepteur P2X7 par l'ATP est ambigu car il s'agit d'un récepteur bifonctionnel. Il se comporte d'une part comme un canal sélectif au Na^+ , K^+ et Ca^{2+} et d'autre part comme un pore plus large non sélectif (macropore) perméable aux molécules hydrosolubles pouvant atteindre une taille maximale de 900 Da. La seule façon de fermer le macropore est d'hydrolyser l'ATP extracellulaire. Ceci explique pourquoi, selon l'activation du récepteur P2X7, tonique, de faible intensité, ou prolongée, ce récepteur a des effets radicalement différents sur la physiologie cellulaire. Comme il l'a été mentionné précédemment dans la partie I.2.6 les variants d'épissage de P2X7 et les mutations pertes de fonction permettent de favoriser le rôle trophique de P2X7, et réduire son rôle cytolytique et constitue ainsi un avantage pour les tumeurs. En effet, P2X7 peut d'une part favoriser la progression de la tumeur en agissant sur la survie et la prolifération des cellules tumorales et d'autre part déclencher un effet cytotoxique antitumoral en induisant la mort cellulaire.

Il est maintenant bien établi que le TME présente une forte concentration en ATPe. Dès 2008, grâce au développement d'une sonde génétiquement codée (*plasma membrane luciferase* (pmeLUC)) qui permet de mesurer *in vivo* la concentration extracellulaire d'ATP, il a été démontré que les niveaux d'ATP dans le milieu extracellulaire des tumeurs solides sont de l'ordre de 100 à 500 $\mu\text{mol/L}$, ce qui est supérieur à la concentration habituelle dans l'interstitium des tissus sains (10 à 100 nmol).

2.2.1. Source d'ATP dans le TME

L'ATP peut être produite après une lésion tissulaire. En effet, les lésions cellulaires entraînent une détérioration de la membrane plasmique et par conséquent, les cellules stressées ou mourantes constituent une source importante d'ATP dans le TME. L'hypoxie elle-même est un puissant stimulus pour la libération d'ATP, même en absence de lésions cellulaires. La concentration intracellulaire d'ATP est de l'ordre de 5 à 10 mM, alors que dans l'espace extracellulaire les concentrations sont de l'ordre du nM, générant ainsi un gradient de concentration d'ATP dirigé vers l'extérieur d'au moins cinq ordres de grandeur. De plus, comme la molécule d'ATP porte deux charges négatives, le gradient électrique favorise également la libération d'ATP, au moins jusqu'à ce que le potentiel de la membrane plasmique s'effondre à la suite d'une lésion. Malgré le contenu élevé en ATPe du TME, un gradient électrochimique dirigé vers l'extérieur pour l'ATP d'au moins deux ordres de grandeur est également présent dans les tumeurs, facilitant l'efflux d'ATP. En plus de cette libération passive, les cellules sont capables de libérer activement de l'ATP.

L'ATP s'accumule dans la lumière des vésicules intracellulaires qui sécrètent leur contenu par exocytose. L'exocytose des vésicules pourrait également contribuer à la libération d'ATP par les LT et

donc jouer un rôle important dans l'augmentation de la concentration d'ATP dans le TME. Dans de nombreux types cellulaires, la libération des nucléotides se produit indépendamment de ce processus d'exocytose. Les voies annexes les plus probables de libération d'ATP sont maintenant considérées comme les canaux sélectifs des anions, tels que les canaux maxi-anion, les canaux anioniques régulés par le volume (VRAC), les homologues humains du gène *tweety* de *Drosophila melanogaster*, et les protéines formant des pores non sélectifs (Lazarowski 2012). Non seulement les cellules immunitaires, mais aussi les cellules cancéreuses disposant au moins de certaines de ces voies (Oviedo-Orta and Evans 2004; Adamson and Leitinger 2014), ce qui conforte l'idée que la libération non lytique est un mécanisme important d'accumulation de l'ATP dans le TME. Parmi ces mécanismes, la pannexine-1 est considérée comme la voie principale d'efflux de l'ATP dans la plupart des types cellulaires (Locovei, Wang, and Dahl 2006). La pannexine-1 est un partenaire polyvalent et modulable de la signalisation purinergique car elle subit une rétro-inhibition par la liaison de l'ATP sur un site de faible affinité situé dans son domaine extracellulaire, empêchant ainsi une accumulation excessive d'ATP dans l'espace extracellulaire. De plus, la pannexine-1 est activée par les récepteurs P2 (Locovei, Wang, and Dahl 2006) ainsi que par les endotoxines bactériennes agissant sur la caspase 11 (Qiu and Dahl 2009) ou pendant l'apoptose induite par les chimiothérapies *via* la caspase 3 (Boyd-Tressler et al. 2014).

2.2.2. Voies de dégradation de l'ATP dans le TME

Dans l'espace extracellulaire, l'ATP et l'ADP sont dégradées par trois groupes d'ectonucléotidases exprimées à la membrane plasmique : les ectonucléosides triphosphate diphosphodolases, CD39 (NTPDase 1), CD39L (NTPDase 2), CD39L3 (NTPDase 3) ; le membre de la famille phosphodiesterase / pyrophosphatase ectonucléotidase CD203a (NPP1), et la phosphatase alcaline (ALP) (Vijayan et al. 2017; Zimmermann, Zebisch, and Sträter 2012). CD39 reste cependant la principale enzyme catalysant la dégradation de l'ATP et de l'ADP en AMP.

L'AMP est également efficacement dégradé par l'ectonucléotidase membranaire CD73 (5'-NT) pour générer de l'adénosine. CD39 et CD73 sont surexprimées dans l'environnement hypoxique du TME par activation des facteurs de transcription SP1 et HIF1 α , augmentant la dégradation de l'ATP et l'accumulation d'adénosine (Synnestvedt et al. 2002; Eltzschig et al. 2009; Li et al. 2017). CD39 est fortement exprimés par les Tregs et dans une moindre mesure par les LT et les lymphocytes B, les DC, les lymphocytes Th17 infiltrant la tumeur (Dwyer et al. 2007) et les macrophages M2 (Montalbán del Barrio et al. 2016). D'autre part, CD39 et CD73 sont également induites par le TGF- β (Ryzhov et al. 2014; Molinier-Frenkel and Castellano 2017).

Une délétion du gène codant pour CD39 entraîne des altérations de l'angiogenèse et une régression tumorale (Jackson et al. 2007), tandis qu'une délétion génétique ou un blocage

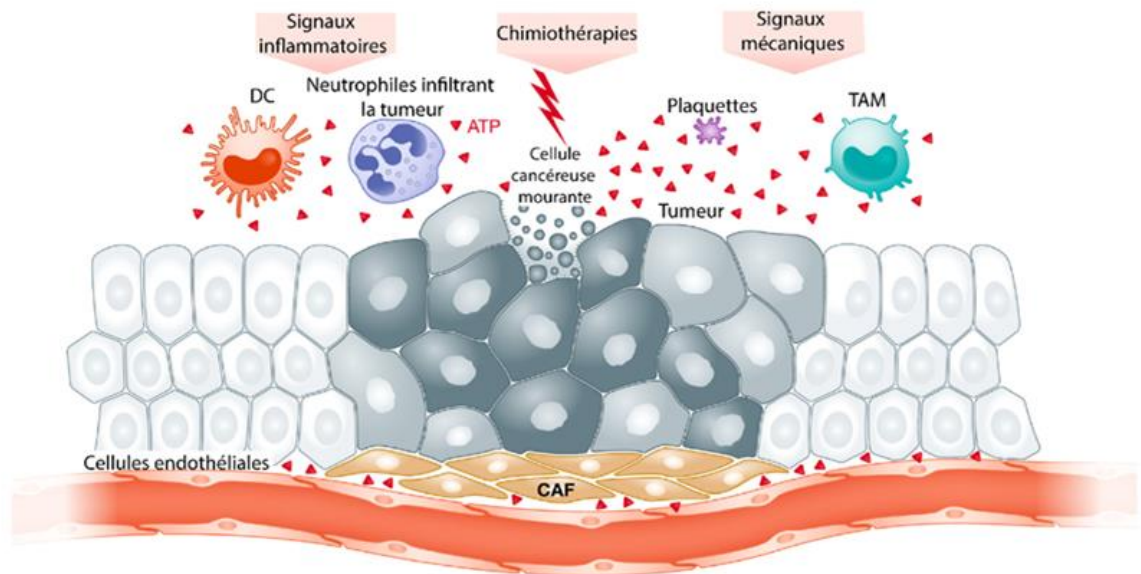
pharmacologique de CD73 augmente l'immunité antitumorale et inhibe le potentiel métastatique (Stagg et al. 2011; 2010). La modulation pharmacologique des enzymes dégradant les nucléotides, CD39 et CD73, et les nucléosides (adénosine désaminase (ADA)) dans le TME peut constituer un moyen efficace d'activer les réponses immunitaires antitumorales (Vijayan et al. 2017). Une activité analogue à celle de CD39, qui pourrait résulter de la sécrétion des formes membranaires de CD39, a été retrouvée dans le plasma humain (Yegutkin et al. 2007). De même, une CD203a soluble et d'autres formes de NPP sont également présentes dans le sang total humain (Yegutkin, Samburski, and Jalkanen 2003). Il est très probable que les ATPases, qu'elles soient des enzymes solubles ou associées à des microvésicules dérivées de la membrane plasmique (Banz et al. 2008), s'accumulent dans le TME où elles sont susceptibles de coopérer avec les ectonucléotidases et permettre la dégradation de l'ATP et la production d'adénosine. L'ATP du TME peut également être recaptée par des voies moins conventionnelles, plus profitables pour le métabolisme des cellules cancéreuses. De récentes études montrent en que certaines lignées cellulaires tumorales peuvent capter de l'ATPe par un mécanisme qui implique au moins en partie la macropinocytose (Qian et al. 2014). Il a été démontré que l'augmentation de la concentration intracellulaire en ATP obtenue par cette voie accroît la résistance de ces cellules cancéreuses aux chimiothérapies (Xuan Wang et al. 2017).

2.2.3. L'ATP extracellulaire structure le TME

Les tumeurs influencent les tissus avoisinants pour générer un environnement inflammatoire, qui permet de supporter leur propre croissance et de supprimer les réponses immunitaires. Dans ce but, elles ne se contentent pas de perturber les fonctions des cellules inflammatoires recrutées mais génèrent également un milieu enrichi en facteurs solubles qui favorisent leur croissance. L'ATP joue un double rôle dans le TME, en fonction non seulement de sa concentration mais aussi du taux d'ectonucléotidases et des propriétés de l'infiltrat cellulaire inflammatoire. L'ATPe est la principale source d'adénosine dans le TME. Ainsi, en fonction du niveau d'expression des ectonucléotidases, notamment CD73, l'ATP peut favoriser indirectement l'immunosuppression en provoquant l'accumulation d'adénosine (Allard et al. 2016). Les cellules cancéreuses n'échappent pas facilement à la surveillance immunitaire car les mutations génèrent des néoantigènes. Ceux-ci sont reconnus par le système immunitaire et les dommages causés aux tissus voisins de l'hôte (en raison de la compression, de la concurrence pour les substrats et de la libération d'agents nocifs) agissent comme des déclencheurs pro-inflammatoires constants. Ainsi le système immunitaire maintient les foyers cancéreux sous contrôle jusqu'à ce qu'une ou plusieurs lésions cancéreuses initiales échappent à la surveillance immunitaire pour générer une tumeur apparente (Mittal et al. 2014). Un des principaux mécanismes responsables de l'échappement tumoral est l'inhibition des réponses immunitaires qui est en partie favorisée par l'accumulation d'ATP et d'adénosine dans le TME (Allard et al. 2017).

L'ATPe agissant sur les récepteurs P2X7 des cellules tumorales promeut l'activité du transporteur de glucose GLUT1 et de nombreuses enzymes de la voie glycolytique. Cela augmente l'acidification du milieu extracellulaire *in vitro* (Amoroso et al. 2012) et contribue probablement à la génération d'un TME immunosuppresseur *in vivo* (Vaupel and Multhoff 2017). De plus l'ATP a un fort effet angiogénique sur les réseaux sanguins intratumoraux. L'ATPe stimule également la génération de ROS dans les cellules phagocytaires principalement au travers de P2X7 (Pfeiffer et al. 2007). La production de ROS par la voie P2X7 est associée à d'autres voies de signalisation intracellulaires qui stimulent Jun N-terminal kinase 1 et 2 (Pfeiffer et al. 2007) ce qui affecte l'activation et la libération du facteur tissulaire (Furlan-Freguia et al. 2011) et favorise la progression du cancer, l'invasion et la propagation métastatique (Bubici and Papa 2014; Yu et al. 2005) (**Figure 12A**).

A



B

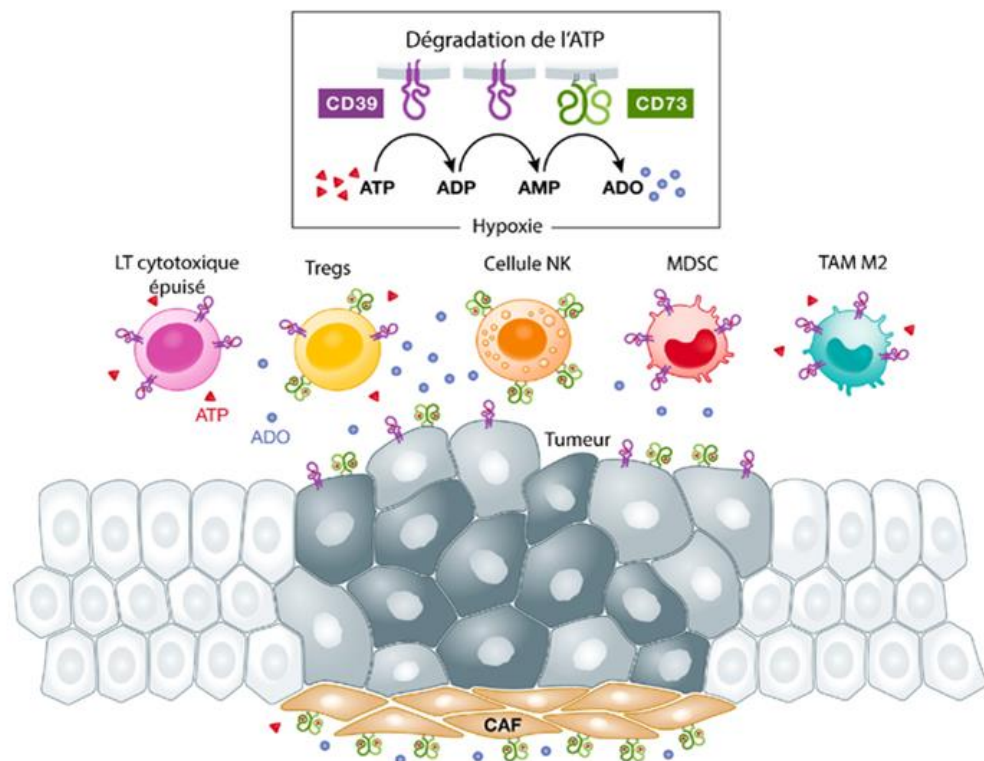


Figure 12 : Homéostasie de l'ATPe dans le microenvironnement tumoral

La concentration d'ATPe dans le TME est déterminée par la balance entre la libération et la dégradation d'ATP. A) Diverses cellules libèrent de l'ATP, soit dans le cadre de leur état physiologique, soit lorsqu'elles répondent à un stress et risquent de mourir, notamment les cellules cancéreuses, les cellules dendritiques (DC), les neutrophiles infiltrant la tumeur, les macrophages associés à la tumeur (TAMs) et les plaquettes. L'hypoxie agit indirectement et à travers son rôle sur l'expression des enzymes CD39 et CD73, un facteur majeur de dégradation de l'ATP dans le TME. B) L'ATPe est catabolisée en AMP puis en adénosine par l'activité séquentielle de CD39 et CD73. CD39 et CD73 sont exprimés par de nombreux types cellulaires peuplant le TME, notamment certaines cellules cancéreuses, les fibroblastes associés au cancer (CAF), les LT cytotoxiques épuisés (*exhausted*), les Tregs, une sous-

population de NK, les TAM de type M2 et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSCs). D'après (Kepp et al. 2021).

2.2.4. Rôle des récepteurs P2 dans la croissance tumorale

De nombreuses études montrent que presque toutes les lignées tumorales et des biopsies de tumeurs solides et hématologiques expriment ou surexpriment la plupart des récepteurs P2 ce qui est souvent associé à un mauvais pronostic (Amoroso et al. 2012; Adinolfi et al. 2012; 2002; McLarnon 2017; Schmid et al. 2015). La stimulation des récepteurs P2 active plusieurs voies trophiques intracellulaires qui supportent la prolifération cellulaire même en absence de facteurs de croissance. Parmi les récepteurs P2Y, P2Y1, P2Y2 et P2Y6 conduisent à la croissance cellulaire cancéreuse en augmentant la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et en activant les voies PI3K-AKT et ERK-MAPK (Baricordi et al. 1999; Adinolfi et al. 2005; Vázquez-Cuevas et al. 2014). Dans la famille P2X, P2X7 est le récepteur le plus souvent associé à la prolifération cellulaire. Comme il l'a été décrit dans la partie 2.6, l'identification de cet effet favorisant la croissance des cellules tumorales était inattendue et pourrait même être paradoxale car ce récepteur est surtout connu pour son activité cytotoxique. Une augmentation du Ca^{2+} mitochondrial et de NFATC1 ainsi que des voies de signalisation PI3K-AKT-GSK3 β ont été identifiés comme des signaux importants conduisant à la croissance cellulaire (Amoroso et al. 2015; Adinolfi et al. 2005; 2009; 2015). Cet avantage conféré par l'expression de P2X7 a été confirmé dans plusieurs études *in vivo* de modèles tumoraux dans des animaux immunocompétents et immunodéficients dans lesquels le blocage de P2X7 s'est révélé être une stratégie antitumorale efficace (Amoroso et al. 2015; Adinolfi et al. 2012; Amoroso et al. 2016). L'ATPe agissant sur les récepteurs P2, notamment *via* le récepteur P2X7 (Di Virgilio et al. 2017; Burnstock and Knight 2018; De Marchi et al. 2016), peut également déclencher la mort des cellules cancéreuses par différentes voies (apoptose et pyroptose) en fonction de sa concentration et du type cellulaire (Burnstock and Di Virgilio 2013). Un rôle pro-apoptotique dans les cellules cancéreuses a également été démontré pour d'autres récepteurs P2 notamment pour P2Y1 et P2Y2 (Wan et al. 2016). Malgré son seuil d'activation élevé, la concentration d'ATPe dans le TME serait suffisante pour déclencher l'ouverture du macropore de P2X7 et donc entraîner la mort cellulaire *in vivo*. En raison de l'expression de P2X7 dans la plupart des types de cellules cancéreuses, la question de savoir pourquoi ce récepteur n'induit pas la mort des cellules cancéreuses a rapidement émergée. Il a été suggéré que les cellules cancéreuses découplent l'activation de P2X7 et l'ouverture de macropores associée à la machinerie de mort cellulaire (Raffaghello et al. 2006). Une autre hypothèse est l'expression de variants différents tels que P2X7B ou des récepteurs P2X7 avec des mutations perte de fonction. Par ailleurs, la forte teneur en cholestérol de la membrane plasmique des cellules cancéreuses pourrait inhiber la formation des

macropores et la cytolysse qui en découle, tout en permettant des flux de Ca^{2+} favorisant la croissance par l'activité canal ionique de P2X7.

2.2.5. Rôle des récepteurs P2 dans l'invasion tumorale et les métastases

Les nucléotides et les récepteurs P2 participent de différentes manières aux processus d'invasion et de métastases tumorales. Les deux familles de récepteurs P2X et P2Y ont toutes deux été décrites comme pouvant stimuler la motilité, la migration et l'invasion des cellules tumorales dans des modèles précliniques (Di Virgilio and Adinolfi 2017; Di Virgilio et al. 2016). La stimulation de P2X7 promeut la libération de cathepsine et de MMP, la migration, l'invasion, et le remodelage de la matrice extracellulaire dans différents types cellulaires tels que dans les cellules modèles HEK-293 transfectées pour exprimer P2X7, les LT humains et les cellules du cancer de la prostate, possiblement *via* la voie AKT (Gu et al. 2000; Adinolfi et al. 2010; Qiu et al. 2014). De plus, l'inhibition ou le blocage pharmacologique de P2X7 diminue l'invasion et la dissémination métastatique dans des modèles expérimentaux de xénogreffes de cancer du sein, de cancer du poumon ou d'adénocarcinomes pancréatiques humains. L'expression de P2X7 est aussi corrélée à l'infiltration des ganglions lymphatiques chez les patients atteints de carcinome papillaire de la thyroïde (Gu et al. 2010). Lors de l'invasion tumorale les cellules cancéreuses émettent des invadopodes, c'est-à-dire des changements morphologiques leur permettant l'invasion des tissus péritumoraux et la migration transendothéliale pour pénétrer dans la circulation sanguine, défini par le terme d'intravasation. Ces processus nécessitent différentes voies de signalisation et notamment la génération de ROS et l'activation de GTPase. Comme plusieurs sous-types de récepteurs P2Y, le récepteur P2X7 peut conduire à ces voies de signalisation. Ainsi, la signalisation purinergique participe à la dissémination des cellules cancéreuses (Pegoraro et al. 2021; Brisson et al. 2020).

La stimulation de P2X7 par l'ATP est l'un des déclencheurs permettant la libération d'exosomes et de microvésicules dérivés de la membrane plasmique. Ces organelles membranaires transportent une cargaison de nombreux composés bioactifs différents tels que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les protéines de l'inflammasome NLRP3, les caspases, l'IL-1 β , les protéases, les microARN ainsi que le facteur tissulaire (thromboplastine) qui contribuent à la composition biochimique du TME et affectent profondément les interactions entre la tumeur et les cellules avoisinantes. Les exosomes et les microvésicules transportent des récepteurs membranaires et des composants cytoplasmiques d'une cellule à l'autre. Ils empruntent la circulation et peuvent parcourir des distances considérables dans le sang pour atteindre des organes distants et participer à la formation de niches pré-métastatiques, mais on ignore si P2X7 est spécifiquement impliqué.

L'ATP est l'intermédiaire intracellulaire universel de transfert d'énergie ainsi qu'un modulateur extracellulaire du métabolisme. La stimulation des récepteurs P2 augmente la synthèse de l'ATP en stimulant la phosphorylation oxydative, comme le font la plupart des récepteurs de la membrane plasmique couplés à la mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires. La stimulation de la phosphorylation oxydative a été décrite pour le récepteur P2Y2 dans les neutrophiles. L'activation des récepteurs P2X1 et P2X7 est également un stimulus très efficace du métabolisme énergétique intracellulaire dans les cellules HEK-293 et dans les cellules leucémiques T Jurkat. Comme décrit précédemment, l'expression basale de P2X7 cause une augmentation du Ca^{2+} mitochondrial matriciel à un niveau suffisant pour stimuler la phosphorylation oxydative mais inférieur aux niveaux toxiques de Ca^{2+} (Adinolfi et al. 2005). Outre la stimulation de la phosphorylation oxydative, le récepteur P2X7 favorise également l'absorption du glucose par une augmentation de l'expression de GLUT1 et soutient la glycolyse aérobie. Il répond ainsi aux besoins énergétiques des cellules cancéreuses et à la demande accrue d'intermédiaires métaboliques produits lors des réactions chimiques (Aswad, Kawamura, and Dennert 2005; Amoroso et al. 2012), qui sont des changements connus pour être caractéristiques de l'effet Warburg. Par conséquent, l'expression de P2X7 permet aux cellules cancéreuses d'exploiter pleinement les voies de production d'énergie intracellulaire, tant oxydative que glycolytique et de générer en même temps les composants moléculaires nécessaires à la prolifération cellulaire. Les cellules endothéliales expriment P2X7 et dépendent de manière cruciale du métabolisme glycolytique pour leur prolifération. Ainsi ce récepteur stimule l'angiogenèse en favorisant la libération de VEGF et en soutenant la glycolyse. **(Figure 13)**

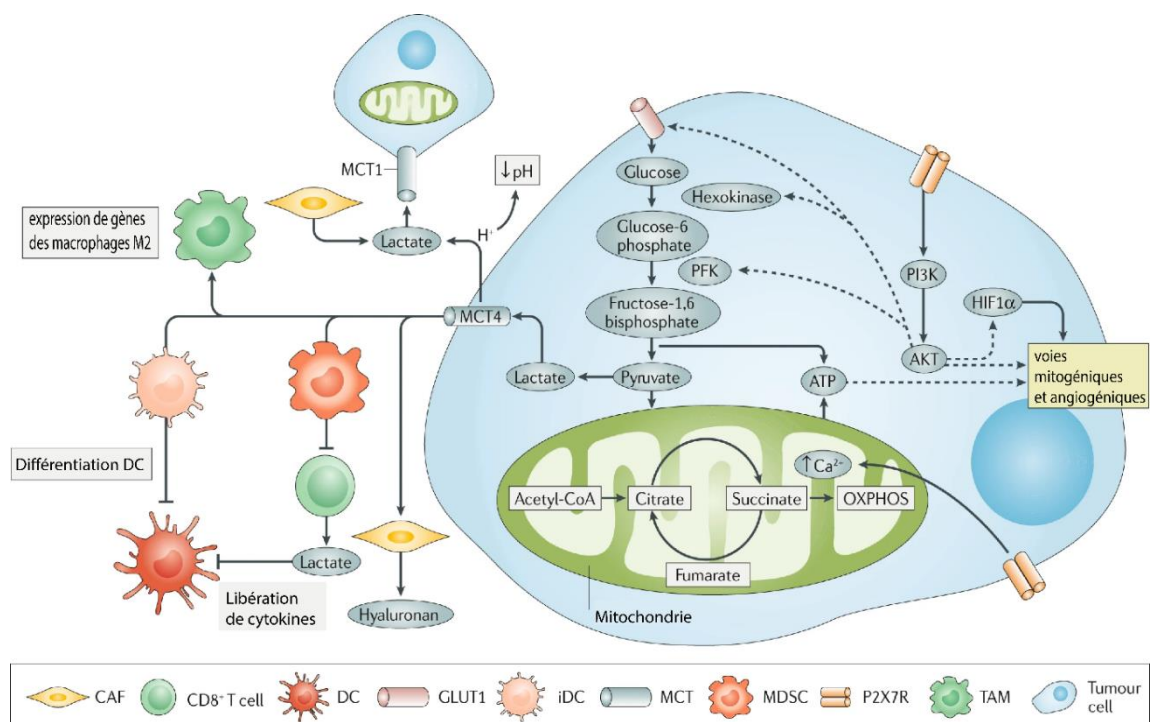


Figure 13 : Stimulation du métabolisme par l'ATP agissant *via* P2X7

Les cellules cancéreuses expriment le récepteur P2X7 à des niveaux élevés. L'activation tonique de P2X7 à faible niveau provoque une augmentation modérée de la concentration mitochondriale de Ca^{2+} , une stimulation de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et une augmentation de la génération d'ATP. En même temps, l'activation de P2X7 régule à la hausse l'expression du transporteur de glucose GLUT1 de la membrane plasmique, probablement *via* la voie PI3K-AKT (indiquée par la flèche en pointillé), et l'expression de plusieurs enzymes de la cascade glycolytique. Cela génère de l'ATP et des métabolites intermédiaires pour la synthèse des constituants cellulaires. L'activation de PI3K-AKT dépendante de P2X7 entraîne également une signalisation dépendante du facteur 1α inductible par l'hypoxie (HIF1 α), stimulant ainsi, par exemple, les voies mitogènes et angiogènes. En tant que promoteur de l'effet Warburg (glycolyse aérobie), l'activation de P2X7 entraîne une augmentation de la production de lactate. Le lactate est libéré des cellules cancéreuses par le transporteur monocarboxylate 4 (MCT4), ce qui entraîne une acidification du microenvironnement tumoral, mais il est également absorbé par le MCT1 et utilisé comme métabolite pour les réactions génératrices d'énergie dans les cellules tumorales. Le lactate inhibe à la fois la différenciation des cellules dendritiques immatures (iDC) en cellules dendritiques matures (DC) et la libération de cytokines par les DC matures, et favorise la différenciation des macrophages M2 et l'activation des cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC). Le lactate est aussi activement libéré par les lymphocytes CD8⁺ et les fibroblastes associés au cancer (CAF) sur lesquels il agit pour stimuler la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire (comme l'hyaluronane), qui peuvent contribuer à la prolifération, à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses. Les flèches en pointillés indiquent les voies potentielles. PFK, phosphofructokinase ; TAM, macrophage associé à une tumeur. D'après (Di Virgilio et al. 2018).

2.2.7. Stimulation de l'autophagie par l'ATPe

L'autophagie est un élément clef de la réponse adaptative de survie des cellules et des organismes entiers à la privation de nutriments, comme la dénutrition, qui est souvent dérégulée dans le cancer (Mowers, Sharifi, and Macleod 2018). P2X7 a été associé de manière diverse à l'autophagie, soit en tant que promoteur, soit en tant qu'inhibiteur (Orioli et al. 2017). Par exemple, une exposition brève de cellules murines de carcinome du colon MC-38 à l'ATPe déclenche l'autophagie et réduit la croissance cellulaire (Bian et al. 2013). L'autophagie participe probablement à la régulation de la concentration d'ATP dans le TME, car la délétion du gène codant pour l'une des protéine majeure de cette voie (*autophagy-related 5* (Atg5)) inhibe la libération d'ATP dans un modèle expérimental de carcinome du colon chez la souris (Michaud et al. 2011). De plus, la libération d'ATP dépendante de l'autophagie est nécessaire pour l'effet antitumoral de la thérapie combinée reposant sur une chimiothérapie (mitoxantrone) et un composé mimant la dénutrition cellulaire (hydroxycitrate) dans un modèle murin de cancer colorectal (Pietrocola et al. 2017). L'équipe de Kroemer a également publiée une étude suggérant un rôle important de l'autophagie dans l'immunogénicité des tumeurs (Michaud et al. 2011).

L'ATP peut être libérée par de multiples voies, une des plus importante étant l'exocytose des lysosomes des cellules tumorales mourantes stimulée par l'autophagie (Wang et al. 2013; Pietrocola et al. 2017).

2.3. Rôle de la signalisation purinergique dans les réponses immunitaires antitumorales

Le TME peut soit favoriser une réponse immunitaire antitumorale, soit promouvoir une immunosuppression qui accélère la progression de la tumeur. Dans ce contexte, il peut être difficile d'étudier le rôle de l'ATP. Le TME est un site hypoxique et acide, fortement infiltré par les macrophages, en particulier les macrophages associés aux tumeurs (*tumour-associated macrophages* (TAM)) et d'autres cellules de la lignée myéloïde, comme les MDSCs, avec une forte activité immunosuppressive ou avec une activité de présentation antigénique réduite (par exemple les DC associées aux tumeurs) (Munn and Bronte 2016). Les lymphocytes suppresseurs ou Tregs sont également parfois surreprésentés dans le TME (Munn and Bronte 2016). Plusieurs facteurs immunosuppresseurs s'accumulent dans le TME tels que le TGF- β , l'arginase, l'indoleamine 2,3-deoxygenase (IDO), l'IL-10 et le VEGF ainsi que d'autres facteurs de croissance, des cytokines, chimiokines et des métalloprotéases matricielles (MMP). L'ATP conduit au recrutement des cellules inflammatoires bien que le mécanisme ne soit pas très bien connu. Il a également été démontré que l'ATP contribuait aux fonctions immunosuppressives des MDSCs par la génération d'AMP, un stimulus pour la formation d'arginase et la libération de TGF- β et d'oxyde nitrique (Bianchi et al. 2014). Dans le TME, les cellules immatures dérivées des myéloïdes peuvent en principe se différencier en DC myéloïdes immunogènes activées, en macrophages inflammatoires M1 ou en cellules plutôt immunosuppressives qui favorisent la résolution de l'inflammation, et la régénération tissulaire (Goldszmid, Dzutsev, and Trinchieri 2014). Il est connu que les nucléotides extracellulaires peuvent moduler la différenciation des DC (Sala et al. 2001; La Sala et al. 2002). Cependant leur rôle sur la différenciation des MDSCs et d'autres cellules myéloïdes dans le TME n'est pas connu. Les DC expriment un large répertoire de récepteurs P2 qui rendent ce type de cellules sensibles à une régulation fine par des nucléotides extracellulaires (Ferrari et al. 2000) notamment sur les propriétés migratoires des DC immatures (Idzko et al. 2002). Les DC en culture en présence d'ATP à de faibles concentrations peuvent subir une maturation atypique, générant des DC qui orientent les LT vers un phénotype favorisant la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 et associé à une capacité limitée à initier une réponse de type Th1, et s'orientant plutôt vers une différenciation en Th2 et Tregs immunosuppresseurs (La Sala et al. 2002). En revanche, les concentrations en ATP les plus élevées déclenchent une libération importante d'IL-1 β qui favorise une réponse immunitaire Th1 (Mutini et al. 1999; Ghiringhelli et al. 2009).

Vis-à-vis particulièrement de la différenciation et de la stimulation des Tregs, l'ATP, en interférant avec la différenciation des DC, peut entraîner une différenciation excessive des Tregs dans le TME (Lecciso et al. 2017; Trabanelli et al. 2012), bien que le mécanisme précis ne soit pas clair. A

l'inverse, l'ATP peut directement diminuer le nombre de Tregs dans le TME, car ce type cellulaire est sensible à la mort cellulaire induite par P2X7 (Aswad, Kawamura, and Dennert 2005). Il peut également inhiber les fonctions des Tregs en favorisant la dégradation de la protéine FOXP3 *via* l'activation de HIF1 α médiée par P2X7 (Dang et al. 2011; Amoroso et al. 2015).

Dans les tumeurs solides, les agents antinéoplasiques qui induisent l'ICD, comme les anthracyclines et l'oxaliplatine, stimulent une réponse immunitaire spécifique de la tumeur qui peut favoriser le succès du traitement. La libération d'ATP par les cellules mourantes constitue une caractéristique de l'ICD. L'ATP libérée au cours de l'ICD fonctionne comme un signal « *find me* » qui attire les phagocytes sur le site de l'ICD. En outre, la stimulation purinergique de ces cellules par l'ATP peut entraîner l'activation de l'inflammasome (Ghiringhelli et al. 2009; Martins et al. 2009; Aymeric et al. 2010). En particulier, les patientes atteintes d'un cancer du sein et porteuses de la mutation E496A entraînant une perte de fonction de P2X7 ont présenté une dissémination plus agressive du cancer pendant le traitement par chimiothérapie (Ghiringhelli et al. 2009). Le renforcement de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par P2X7 dans les cellules myéloïdes favorise la réponse antitumorale des LT CD8⁺ infiltrant la tumeur (Li et al. 2019). En conséquence, les souris déficientes pour P2X7 greffées avec une tumeur ont présenté une absence d'infiltration inflammatoire et une progression accélérée de la tumeur (Adinolfi et al. 2015). Une autre étude de Hofman et collaborateurs a également démontré le rôle de P2X7 dans l'immunité antitumorale dans un modèle de carcinogénèse *in situ* associée à la colite (Hofman et al. 2015). Dans cette étude, les auteurs ont étudié le rôle de P2X7 dans le modèle de carcinogénèse associée à la colite et démontré en utilisant des souris déficientes ou un antagoniste pharmacologique spécifique de P2X7, que l'activité de P2X7 réprime le développement tumoral. Ils ont démontré que l'inactivation de P2X7 conduit à une surproduction de TGB1, un recrutement de Tregs dans les lésions inflammatoires et une prolifération des cellules épithéliales coliques médiée par le TGFB1.

Par ailleurs, la signalisation passant par la GMP-AMP synthase cyclique stimulant les gènes de l'interféron (cGAS-STING) est impliquée dans la détection des tumeurs par les cellules immunitaires innées (Deng et al. 2014; Woo et al. 2014). Récemment, il a été démontré que l'activation de P2X7 facilite le transfert de cGAMP dérivé de la tumeur vers les TAM, ce qui renforce la réponse interféron de type I dépendante de STING et l'immunogénicité de la tumeur (Zhou et al. 2020). Enfin il a été démontré que la stimulation de P2X7 à la surface des DC potentialisait l'efficacité des traitements basés sur le blocage des points de contrôle immunitaires chez les souris atteintes d'un cancer du poumon non à petites cellules en augmentant la production d'IL-18. En effet, la stimulation de P2X7 a conduit à l'augmentation d'IL-18 lié à l'activation de l'inflammasome. A son tour l'IL-18 active les NK et les LT CD4⁺ pour produire de l'IFN- γ et par conséquent augmente l'immunogénicité des tumeurs. De

plus, l'activation de P2X7 combinée à l'inhibiteur de point de contrôle immunitaire anti-PD-1 permet une régression tumorale, suivie de l'établissement d'une réponse immunitaire mémoire robuste (Douguet et al. 2021).

D'autre part, P2X7 est exprimé par les cellules immunosuppressives innées, telles que les MDSC, où son activité peut favoriser la production de ROS, l'accumulation d'Arginase-1 et la libération de TGF- β , favorisant ainsi l'immunosuppression (Bianchi et al. 2014). En accord avec l'immunosuppression innée médiée par P2X7, il a été récemment démontré que P2X7 est fortement exprimé dans les TAMs et stimule la polarisation de type M2 via la dérégulation de la phosphorylation de STAT6 et IRF4 à la fois *in vivo* et *in vitro* (Qin et al. 2020).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'activité de P2X7 peut moduler différentes cellules du système immunitaire inné dans le TME avec des résultats opposés sur le contrôle de la croissance tumorale (**Figure 14**).

En revanche, comme décrit dans la section 4.2.5, P2X7 joue un rôle positif dans l'établissement et le maintien de LT CD8⁺ murins centraux mémoires et résidant dans les tissus (Trm) à longue durée de vie (Borges da Silva et al. 2018)(Borges da Silva et al. 2020). Ces résultats sont difficiles à concilier avec les études montrant que l'activité de P2X7 *in vivo* entraîne une déplétion spécifique des Trm (Stark et al. 2018) et des LT effecteurs mémoires (Hashimoto-Hill et al. 2017). Il a été démontré que les nucléotides extracellulaires libérés lors d'une infection ou d'une lésion tissulaire épuisent les Trm par l'intermédiaire de P2X7, à moins qu'ils ne soient stimulés par un TCR qui internalise fortement P2X7 (Stark et al. 2018) comme le montrent les cellules Tfh de l'intestin grêle (Proietti et al. 2014). En raison des propriétés de canal ionique et macropore du récepteur, P2X7 pourrait contribuer au maintien autonome du pool de LT mémoires à l'état stable en favorisant l'activité mitochondriale par le biais de son activité de canal ionique permettant l'influx tonique de Ca²⁺. Des concentrations élevées d'ATPe (par exemple au cours d'une inflammation) sans engagement concomitant du TCR entraîneraient l'ouverture du macropore et la mort cellulaire, sélectionnant ainsi les seules cellules stimulées par l'antigène capables quant à elles de résister à la mort induite par l'ATPe (**Figure 14**).

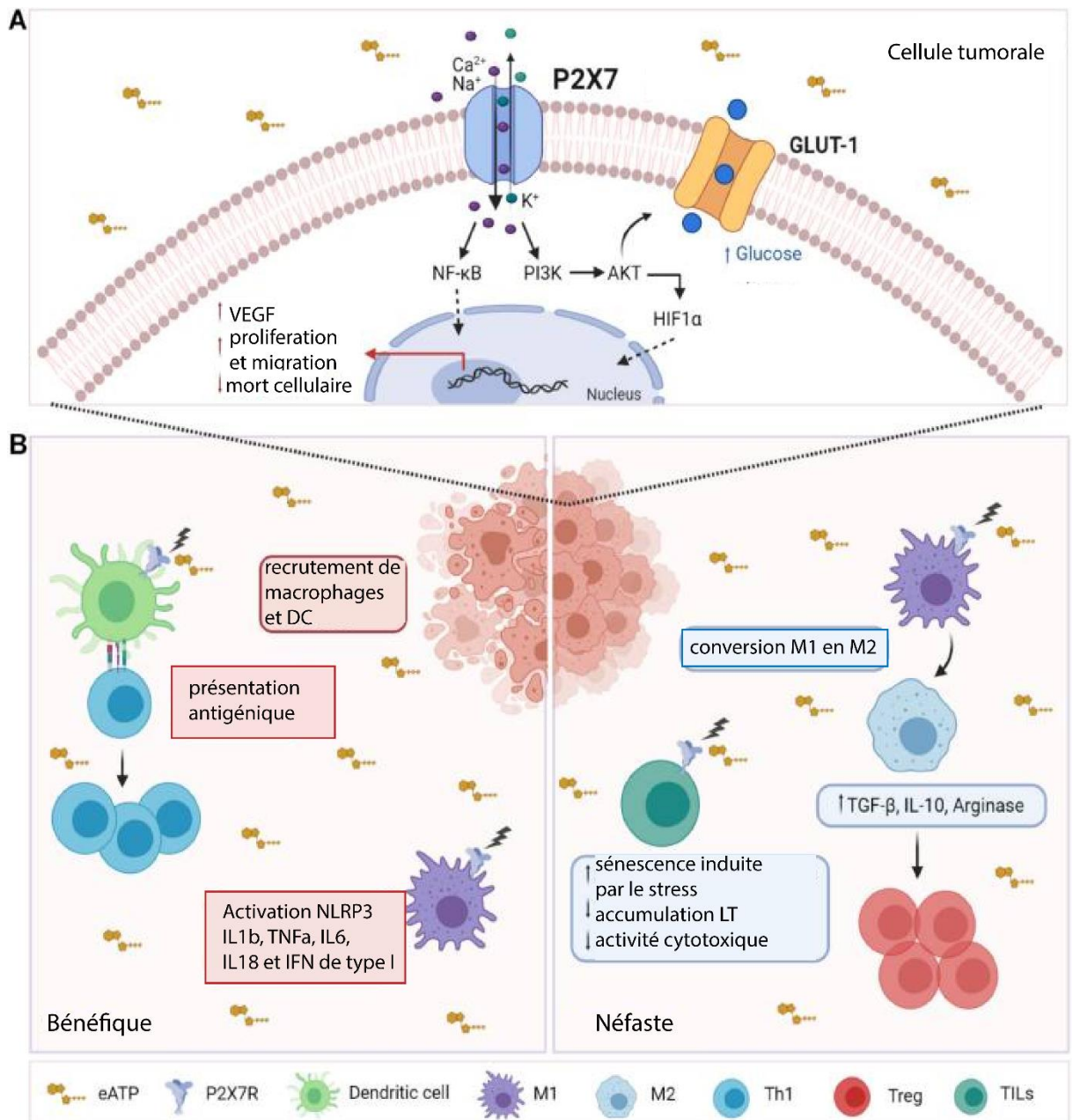


Figure 14 : Influence de l'activité de P2X7 sur les cellules tumorales et le système immunitaire

- (A) Dans les cellules tumorales, la stimulation de P2X7 par l'ATPe entraîne un influx de Ca²⁺, l'activation des voies de signalisation NF-κB, PI3K/AKT conduisant à la translocation nucléaire de HIF1α et NF-κB, l'augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire, et la sécrétion de VEGF. De plus, la stimulation de P2X7 régule à la hausse le transporteur de glucose GLUT-1, favorisant la voie glycolytique et la phosphorylation oxydative qui permettent aux cellules tumorales de proliférer *in vitro* en l'absence de sérum.
- (B) Dans le TME, l'ATPe est associée à des effets bénéfiques (résumé dans l'encadré à gauche) comme à des effets délétères vis-à-vis des réponses immunitaires antitumorales (encadré de droite). Dans le TME, l'ATPe est libérée par les cellules tumorales et peut fonctionner comme un DAMP, induisant le recrutement et l'activation des macrophages et des DC. L'activation de P2X7 par l'ATPe déclenche plusieurs réponses dans les DC, telles que la maturation, la migration et la présentation des antigènes. De plus, la libération de K⁺ conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-18, et IFN de type I. L'activation de P2X7 favorise l'immunosuppression par les MDSC en stimulant la libération de ROS, d'arginase 1 (ARG1) et

de TGF- β 1, ce qui, à son tour, conduit à l'expansion des Tregs. En outre, P2X7 favorise la conversion des macrophages de type M1 en M2. L'activité de P2X7 dans les TILs favorise la sénescence cellulaire induite par le stress, limitant ainsi leur expansion et leur activité cytotoxique. D'après (Grassi and De Ponte Conti 2021).

2.3.1. P2X7 dans la réponse des LT antitumoraux.

Dans les tumeurs solides, l'étendue de l'infiltration des LT est corrélée à un meilleur pronostic pour les patients. A l'origine, il a été constaté dans le mélanome cutané primaire que l'abondance des lymphocytes infiltrant la tumeur avait une forte valeur prédictive de l'augmentation de la survie (Clark et al. 1989). Par la suite, il a été démontré que la présence de LT intratumoraux était corrélée à une amélioration des résultats cliniques dans les cas du carcinome ovarien avancé (Zhang et al. 2003). Le rôle de l'immunité adaptative dans le contrôle de la croissance tumorale a également été suggéré dans les cancers colorectaux, où l'accumulation de LT mémoires et effecteurs était associée à une diminution de la dissémination et à une survie prolongée (Pagès et al. 2005).

L'absence d'infiltration inflammatoire et l'accélération de la progression tumorale chez les souris déficientes pour P2X7 suggèrent son rôle bénéfique dans le contrôle de la croissance tumorale et dans les réponses immunitaires antitumorales (Adinolfi et al. 2015). A l'inverse, le blocage pharmacologique de P2X7 avec A740003 a montré des effets contradictoires. L'immunophénotypage des cellules infiltrant la tumeur chez des souris déficientes pour P2X7 et chez les souris traitées avec A740003 a révélé une composition différente des sous-populations de LT. Une forte diminution des LT effecteurs CD8⁺ et une augmentation des Tregs ont distingué les tumeurs implantées dans les souris déficientes pour P2X7. Dans cette étude, l'antagoniste de P2X7 induit une augmentation des LT effecteurs tout en laissant inchangés les nombres de LT CD8⁺ et Tregs, ce qui suggère que l'inhibition de P2X7 affecterait plutôt l'expansion des LT effecteurs (De Marchi et al. 2019). Plus récemment, il a été démontré que l'inhibition de l'activité de la MAPK p38, dont l'activité peut être stimulée par P2X7, influence positivement l'expansion cellulaire, la différenciation, le stress oxydatif et le stress génomique des LT antitumoraux, améliorant ainsi l'activité tumoricide des LT murins et renforçant la compétence des LT humains réactifs aux tumeurs et issus du génie génétique (Gurusamy et al. 2020). L'absence de P2X7 dans les LT est corrélée à une signature transcriptionnelle associée à une réponse accrue des LT cytotoxiques dans les tumeurs solides humaines. Ainsi selon ce modèle, le ciblage de P2X7 dans les TILs effecteurs pourrait permettre un « rajeunissement » capable de soutenir la réponse antitumorale (Romagnani et al. 2020).

2.3.2. La signalisation purinergique dans la mort immunogénique

La mort cellulaire immunogénique (ICD) est un type de mort cellulaire associé à la libération de DAMPs dans l'espace extracellulaire, comme la libération d'ATP et de la protéine B1 du groupe à haute mobilité (HMGB1), ou bien à l'exposition de DAMPs sur la membrane plasmique telle que

l'exposition de la calréticuline (Kroemer et al. 2013; Galluzzi et al. 2017). Plusieurs agents chimiothérapeutiques comme les anthracyclines et l'oxaliplatine déclenchent l'ICD, transformant ainsi les cellules tumorales mourantes en un « vaccin » endogène qui fournit simultanément l'antigène (sous la forme d'antigènes tumoraux) et l'adjuvant (DAMPs libérés ou exposés en surface). De cette façon, une réponse immunitaire efficace contre les tumeurs peut être générée et pourra favoriser l'efficacité thérapeutique à long terme. Il a été démontré que l'ATPe joue un rôle central dans l'ICD (Kepp et al. 2017). L'immunogénicité des cellules mourantes par ICD repose sur leur capacité à augmenter la stimulation des LT CD4⁺, CD8⁺, Th17 par les DC et à promouvoir une réponse immunitaire cytotoxique antitumorale efficace (Garg et al. 2014). La stimulation de l'inflammasome NLRP3 par l'activation de P2X7, dans un modèle murin de cancer du sein, s'est avérée entraîner la maturation et la libération de l'IL-1 β par les DC. De plus, la radiothérapie semble également capable de déclencher la libération d'ATP par les mélanomes murins B16 *via* P2X7, ce qui suggère un rôle de P2X7 dans l'ICD radio-induite, mais aussi, plus largement, dans les lésions cellulaires radio-induites (Ohshima et al. 2010).

L'ATPe a également un rôle dans l'immunostimulation. L'ATPe remplit deux fonctions principales : elle agit comme un signal chimiotactique pour les cellules myéloïdes, en se liant au récepteur P2Y2 (Elliott et al. 2009) et elle favorise, au travers de P2X7, l'activation de l'inflammasome et donc la sécrétion dépendante de la caspase 1, de formes matures de l'IL-1 β et de l'IL-18 (Perregaux et al. 2000) (**Figure 15**). Il est important de noter que ces deux effets sont nécessaires à l'activation optimale des réponses immunitaires spécifiques des tumeurs par des chimiothérapies immunogènes. Cela a été démontré chez les souris déficientes pour les gènes *P2ry2*, *P2rx7*, *Casp1*, et *IL18* ainsi que chez des souris dépourvues du gène *Nlrp3* ou *Il1r1*, ou celles traitées avec un antagoniste des récepteurs purinergiques (suramine) ou un anticorps bloquant l'IL-1 β (Ghiringhelli et al. 2009; Aymeric et al. 2010). Dans ce contexte, les précurseurs des DC, recrutés dans le TME par l'intermédiaire de l'ATP libérée par les cellules cancéreuses succombant à l'ICD induite par la chimiothérapie, sont stimulés par les molécules dérivées de l'activation de l'inflammasome et migrent vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur ou les structures lymphoïdes tertiaires pour amorcer l'immunité adaptative antitumorale. Les précurseurs des DC recrutent également une population de LT $\gamma\delta$ productrice d'IL-17 qui est essentielle à la stimulation des LT cytotoxiques CD8⁺ (Ma et al. 2011).

Il a été récemment démontré que l'activité chimiotactique de l'ATP sur les DC implique également P2X7 et la pannexine-1, ce qui suggère l'existence d'une boucle de rétroaction positive par laquelle les réserves intracellulaires d'ATP peuvent contribuer à la capacité migratoire des DC (Saéz et al. 2017). En outre, des niveaux élevés d'ATPe semblent induire une pyroptose dans les macrophages intratumoraux exprimant P2X7, ce qui favorise l'immunité antitumorale médiée par les LT (Bidula et

al. 2019). Cependant, l'ATPe peut avoir des fonctions tumorigènes directes. Plus précisément, la libération d'ATP par les plaquettes déclenche une cascade de signaux dépendante de P2Y2 qui favorise l'extravasation tumorale et la dissémination métastatique lors de l'ouverture des barrières endothéliales (Schumacher et al. 2013; Chen et al. 2019) (**Figure 15**).

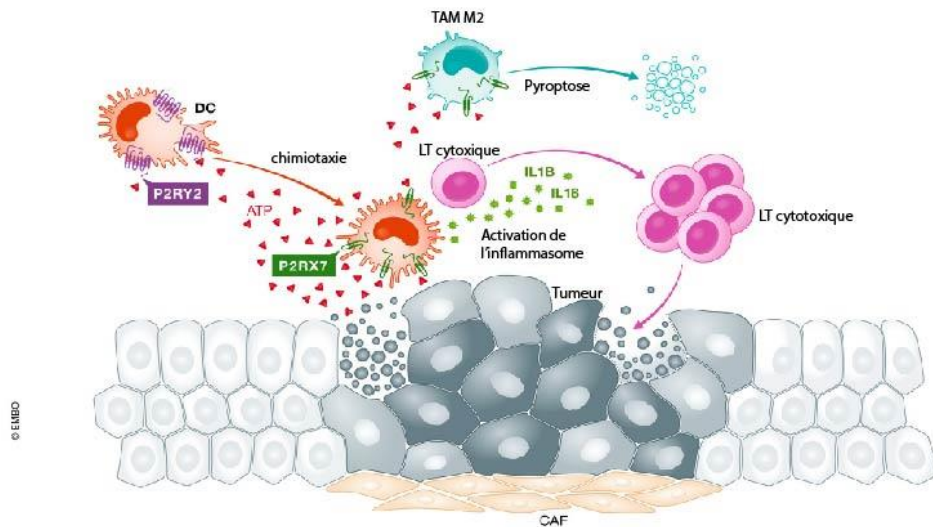


Figure 15 : Immunostimulation par l'ATP extracellulaire

L'ATPe exerce des effets chimiotactiques sur les cellules myéloïdes en se liant au récepteur purinergique P2Y2 et favorise la sécrétion dépendante de l'inflammasome de l'IL-1 β et de l'IL-18 en se liant au récepteur P2RX7. Ces effets sont essentiels pour que les DC puissent activer les LT cytotoxiques CD8⁺ contre les antigènes dérivés de la tumeur et donc initier une immunité adaptative anticancéreuse. Parallèlement, l'ATPe déclenche la pyroptose dans les macrophages associés aux tumeurs (TAM), ce qui a pour effet d'appauvrir le TME en cellules immunosuppressives et d'émettre des signaux immunostimulants dépendant de la pyroptose. D'après (Kepp et al. 2021).

III- Les voies de manipulations pharmacologiques et biologiques de la signalisation purinergique

1. La signalisation purinergique et les points de contrôle immunitaires

1.1. Les points de contrôle immunitaires classiques

Le développement d'inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (*Immune checkpoint inhibitors* (ICI)) est une avancée majeure dans le domaine de l'immuno-oncologie. Les cellules tumorales échappent à l'immunosurveillance et progressent grâce à différents mécanismes, notamment la manipulation positives des voies de contrôle immunitaires qui suppriment les réponses antitumorales. Les ICI réactivent les réponses immunitaires antitumorales en bloquant les voies de signalisation co-inhibitrices et favorisent l'élimination des cellules tumorales.

1.1.1. CTLA-4

Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) a été découvert dans une bibliothèque d'ADNc de LT cytotoxiques. Cette molécule appartient à la superfamille des immunoglobulines et est exprimée principalement par les LT activés (Brunet et al. 1987). Bien que CTLA-4 se lie aux mêmes ligands B7 (CD80 et CD86) sur les cellules B et les CPA que son homologue CD28, la stimulation de CTLA-4 n'entraîne pas l'activation des LT mais conduit à l'inhibition de la production des anticorps dépendants des LT et la prévention des rejets d'allogreffes (Lenschow et al. 1992; Linsley et al. 1992) (**Figure 16**). En 1994, il a été découvert que la cinétique de l'expression de CTLA-4 était différente de celle de CD28. Alors que CD28 est exprimé sur les LT naïfs, l'expression de CTLA-4 est induite 2 à 3 jours après la stimulation des LT médiée par le TCR et CD3. Le blocage de l'interaction entre CTLA-4 et les molécules B7 par des anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 entraîne une potentialisation de la réponse réactive, en lien avec l'inhibition du signal inhibiteur dépendant de CTLA-4 (Walunas et al. 1994). Par conséquent, alors que la liaison de CD28 est importante pour l'activation complète des LT, l'engagement de CTLA-4 constitue une voie d'inhibition de l'activation des LT. Ce rôle de CTLA-4 a été corroboré *in vivo* par la génération de souris déficientes pour CTLA-4 (Waterhouse et al. 1995). Ces souris se développent normalement jusqu'à la naissance, mais présentent ensuite un syndrome lymphoprolifératif conduisant à une infiltration diffuse de lymphocytes dans de nombreux organes, y compris le myocarde. En général, ces animaux succombent de maladies auto-immunes dès l'âge de 3 à 4 semaines. Les LT de ces animaux présentent un phénotype hautement activé et prolifèrent plus intensément suite à leur stimulation, que les LT sauvages. Le nombre de LT CD4⁺ et CD8⁺ augmente fortement mais leur ratio reste inchangé. Ces résultats indiquent que CTLA-4 joue un rôle important dans la régulation de l'activation des LT. Ces connaissances sur le mécanisme d'action de CTLA-4 ont conduit à l'hypothèse que le blocage de CTLA-4 pouvait restaurer les réponses immunitaires antitumorales.

Un certain nombre de modèles différents ont été proposés pour expliquer le mécanisme de la fonction de CTLA-4. Le plus simple d'entre eux implique une compétition entre CD28 et CTLA-4 pour la liaison du ligand, ce qui a été proposé parallèlement à d'autres modèles de signalisation inhibitrice intrinsèque à la cellule (Walker and Sansom 2015; Rudd 2008; Bour-Jordan et al. 2011). Cependant, les LT CD4⁺ des souris déficientes pour CTLA-4 présentent un phénotype hyperactivé et pathogène. La présence de cellules exprimant CTLA-4 dans des souris chimériques peut prévenir la maladie et normaliser le phénotype des LT CD4⁺ déficients pour CTLA-4 par un mécanisme dominant extrinsèque à la cellule (Mak et al. 1999).

Un mécanisme moléculaire qui va dans le sens d'un rôle extrinsèque dominant de CTLA-4 est la capture physique de CD80 et CD86, et leur élimination ultérieure des CPA : un processus connu sous

le nom de trans-endocytose (Qureshi et al. 2011). La trans-endocytose nécessite la reconnaissance du peptide par les LT et représente un mécanisme spécifique de l'antigène pour contrôler les niveaux d'expression de CD80 et CD86 sur les CPA. En résumé, CTLA-4 est une molécule hautement endocytaire qui se lie à deux ligands distincts, CD80 et CD86, ce qui entraîne leur élimination des CPA opposées. En utilisant la trans-endocytose, CTLA-4 peut agir comme un mécanisme de régulation immunitaire en réduisant directement la capacité des CPA à stimuler *via* CD28. Ce concept permet d'expliquer pourquoi un récepteur agoniste et un récepteur antagoniste partagent les mêmes ligands et englobe la nature endocytaire de CTLA-4. Dans l'ensemble, ce modèle suggère que le système CD28/CTLA-4 peut réguler l'activation des LT à la hausse ou à la baisse.

Dans une première étude réalisée par Allison et ses collaborateurs (Leach, Krummel, and Allison 1996), l'administration d'un anticorps monoclonal antagoniste de CTLA-4 a permis le rejet d'un carcinome du colon murin ou d'un sarcome murin. Les tumeurs établies ont été rejetées par ce traitement et les souris étaient protégées d'une seconde inoculation de ces tumeurs. Cependant, dans les tumeurs plus agressives et moins immunogènes, comme le mélanome murin B16, l'anti-CTLA-4 n'était guère efficace en tant que traitement unique. Associé à un vaccin contre les cellules tumorales exprimant le GM-CSF, le taux de rejet tumoral a pu être amélioré pour passer de 16% pour le vaccin seul à 80% pour le traitement combiné (Van Elsas, Hurwitz, and Allison 1999). L'ipilimumab, un anti-CTLA-4, est le premier ICI à avoir été autorisé dans le traitement des mélanomes métastatiques. Cependant, le blocage de CTLA-4 chez l'homme est accompagné d'importants effets secondaires, incluant des colites, hépatites, dermatites, et uvéites. Lever les points de contrôle immunitaires semble donc efficace seul ou en combinaison à d'autres traitements mais est également associé à des effets secondaires importants, mais cliniquement souvent sans gravité sur le long terme.

1.1.2. PD-1/PD-L1

Le gène *PDCD1* codant pour la protéine PD-1 a été découvert en 1992 par l'équipe de Honjo (Ishida et al. 1992) comme un gène codant pour une protéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines, dont l'expression était induite dans les thymocytes mourants, d'où son nom de récepteur de la mort programmée (*Programmed cell death protein 1*). Il a été démontré par la suite que l'expression de PD-1 était induite dans les lymphocytes et les monocytes lors de l'activation des cellules et n'était pas impliquée dans l'apoptose. PD-1 est un inhibiteur des réponses immunitaires innées et adaptatives, et est exprimé sur les LT activés, les NK, les lymphocytes B, les macrophages, les DC et les monocytes (Ahmadzadeh et al. 2009). Il est à noter que PD-1 est également fortement exprimé sur les LT spécifiques des tumeurs. Les facteurs de transcription tels que NFAT, NOTCH, FOXO1, IRF9 peuvent déclencher la transcription de PD-1 (Staron et al. 2014). PD-1 joue deux rôles

opposés, car il peut être à la fois bénéfique et néfaste. En ce qui concerne ses effets bénéfiques, il joue un rôle clé dans la réduction de la régulation des réponses immunitaires inefficaces ou néfastes et dans le maintien de la tolérance immunitaire. Cependant PD-1 provoque la prolifération des cellules malignes en interférant avec les réponses immunitaires antitumorales. Les souris déficientes en PD-1 développent tardivement une arthrite systémique et une glomérulonéphrite après croisement avec des souris transgéniques exprimant un TCR autoréactif. Ces animaux développent un syndrome létal, avec une infiltration de cellules inflammatoires dans le derme, les poumons, les reins et d'autres tissus (Nishimura et al. 1999). Peu de temps après sa découverte, les gènes codants pour les ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2, ont été clonés, montrant que ces molécules appartiennent à la famille B7 (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001). Bien que la distribution tissulaire de ces ligands semble être différente, avec une expression plus large de PD-L1 et une expression plus restreinte au lignage des cellules hématopoïétiques de PD-L2, l'engagement de PD-1 sur le LT entraîne une régulation négative de la signalisation médiée par le TCR, ce qui aboutit à une absence de réponse fonctionnelle des LT (**Figure 16**). PD-L1 est généralement exprimé par les macrophages, certaines LT et lymphocytes B activés, les DC et certaines cellules épithéliales, en particulier dans des conditions inflammatoires (Sharpe et al. 2007). En outre, PD-L1 est exprimé par les cellules tumorales comme un "mécanisme immunitaire adaptatif" pour échapper aux réponses antitumorales (Ohaegbulam et al. 2015). L'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales peut résulter de mécanismes intrinsèques, comme la délétion de PTEN qui active la voie de la PI3K, ou de stimuli extrinsèques tel que l'IFN- γ sécrété par les LT activés environnants (Parsa et al. 2007; Pardoll 2012). Cette expression de PD-L1 rend inactifs les LT spécifiques de la tumeur et, par conséquent, peut être un mécanisme d'échappement tumoral. En effet, le blocage de l'interaction entre les cellules tumorales exprimant PD-L1 et les LT spécifiques de la tumeur exprimant PD-1 renforce l'activité cytotoxique des LT (Iwai et al. 2002; Hirano et al. 2005).

PD-L1 est associé à un environnement immunitaire riche en LT CD8⁺, à la production de cytokines Th1 ainsi que d'interférons et a des caractéristiques d'expression génique spécifiques. Il a été démontré que l'IFN- γ régule à la hausse PD-L1 dans les cellules du cancer de l'ovaire, ce qui est responsable de la progression de la maladie, tandis que l'inhibition du récepteur à l'IFN- γ peut réduire l'expression de PD-L1 dans les modèles de souris atteints de leucémie myéloïde aiguë par le biais des voies MEK/ERK et MYD88/TRAF6 (Abiko et al. 2015). L'IFN- γ induit la PKD2, qui est importante pour la régulation de PD-L1. L'inhibition de l'activité de PKD2 inhibe l'expression de PD-L1 et favorise une forte réponse immunitaire antitumorale. Les cellules NK sécrètent l'IFN- γ par l'intermédiaire des voies JAK1, JAK2 et STAT1, ce qui augmente l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales (Bellucci et al. 2015). Des études sur des cellules de mélanome ont montré que l'IFN- γ sécrété par le LT *via* la voie JAK1/JAK2-STAT1/STAT2/STAT3-IRF1 peut réguler l'expression de PD-L1. Les cellules T et NK semblent

sécréter l'IFN- γ , qui induit l'expression de PD-L1 à la surface des cellules cibles, y compris les cellules tumorales (Garcia-Diaz et al. 2017).

La signalisation par PD-L1 rend les cellules tumorales insensibles à l'apoptose induite par les LT, ce qui suggère que PD-L1 est une molécule anti-apoptotique présente dans les cellules cancéreuses (Azuma et al. 2008). PD-L1 agit comme un facteur pro-tumorigène dans les cellules cancéreuses en se liant à ses récepteurs et activant les voies de signalisation de la prolifération et de la survie (Dong et al. 2018). Cette découverte indique que PD-L1 est impliqué dans la progression tumorale. En outre, il a été démontré que PD-L1 exerce des effets prolifératifs non immunitaires sur une variété de types de cellules tumorales. Par exemple, PD-L1 a induit une transition épithélio-mésenchymateuse et des phénotypes de type cellule souche dans des cellules de cancer du rein, ce qui indique que la présence de la voie intrinsèque de PD-L1 favorise la progression du cancer du rein (Nunes-Xavier et al. 2019).

Le Nivolumab, un anti-PD-1 a ensuite été autorisé dans le traitement du mélanome métastatique.

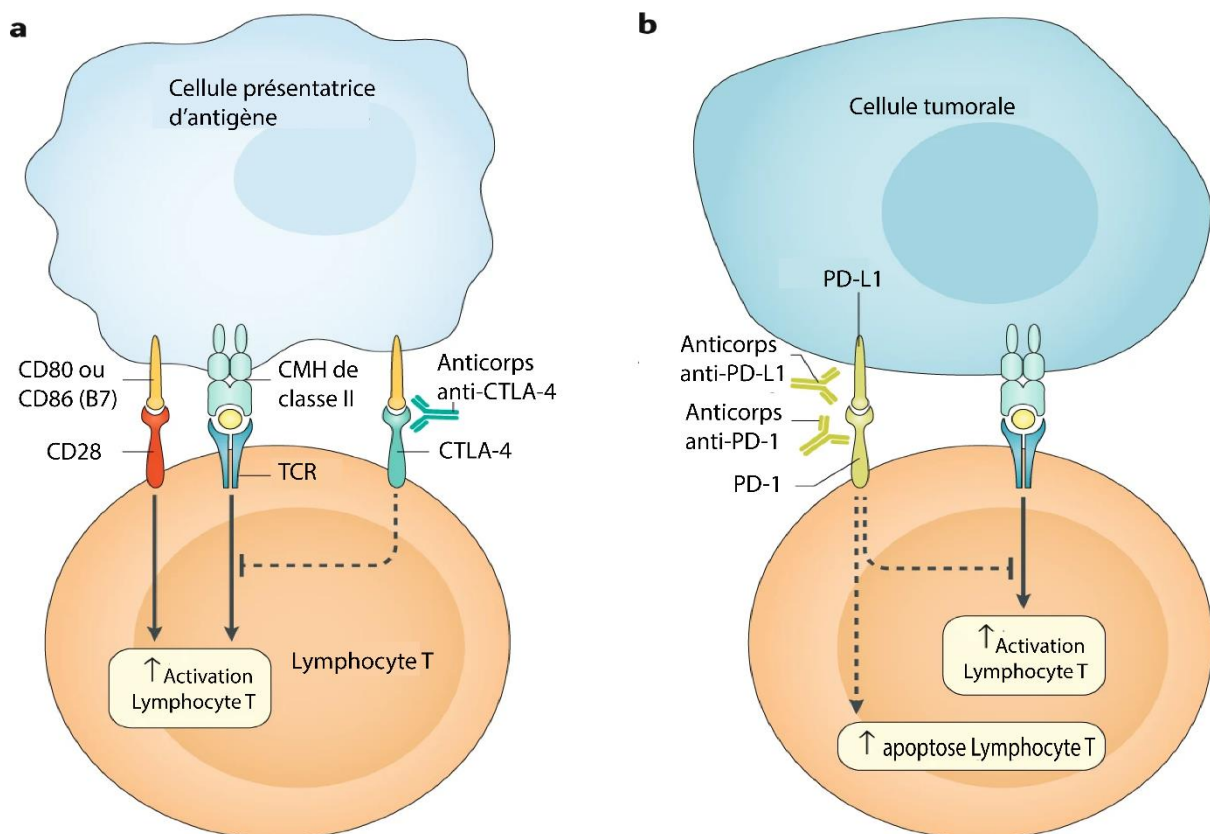


Figure 16 : Effet des anticorps anti-points de contrôle immunitaires

Les anticorps ciblant CTLA-4 vont empêcher l'interaction entre CTLA-4 sur le lymphocyte T et CD80/CD86 ou B7 sur la cellule présentatrice d'antigène. Ceci permet l'activation du LT dirigé contre la tumeur. Les anticorps ciblant les points de contrôle immunitaires PD-1 et PD-L1 vont empêcher l'interaction entre ce récepteur et ses ligands et donc empêcher l'inhibition du LT dirigé contre la

cellule tumorale. Ce blocage efficace va permettre l'élimination de la cellule tumorale. D'après (Ramos-Casals et al. 2020).

A ce jour, des centaines d'essais cliniques de phases I et II et de phases III/IV sont menés dans le monde afin d'évaluer l'efficacité de plusieurs ICI en monothérapie ou en thérapie combinée.

1.2. CD39 et CD73 comme nouveaux points de contrôle immunitaires.

1.2.1. CD39 et CD73 dans le TME

Les médiateurs purinergiques, tels que l'ATP et l'adénosine sont présents en forte concentration dans le TME. L'ATP est dégradée en adénosine par l'activité séquentielle de la voie CD39/CD73. Cela génère un environnement immunosuppresseur riche en adénosine. Le concept de bloquer l'activité des ectonucléotidases CD39 ou CD73 ou d'inhiber la fixation de l'adénosine sur son récepteur afin de promouvoir une meilleure réponse antitumorale a alors intéressé de nombreuses équipes. CD73 est une source majeure d'adénosine dans la signalisation purinergique, cette enzyme hydrolyse l'AMP en adénosine qui est capable d'activer les quatre récepteurs P1 à l'adénosine A_1 , A_{2A} , A_{2B} , et A_3 . CD73 est également une molécule de signalisation et d'adhésion qui module l'interaction des cellules avec les composants de la matrice extracellulaire. CD73 joue donc un rôle central dans la régulation des propriétés invasives et métastatiques des cancers. Une thérapie anti-CD73 semble donc être une approche prometteuse pour le traitement des cancers dans le futur.

1.2.2. CD39 dans l'immunité antitumorale

L'expression de CD39 joue un rôle permissif dans des modèles murins de métastases hépatiques basée sur injection intraveineuse de cellules de mélanome B16-F10 et de cellules de cancers du côlon MC-26 (Künzli et al. 2011). La croissance des tumeurs métastatiques du mélanome a été fortement diminuée chez les souris déficientes pour CD39, ou celles reconstituées avec de la moelle osseuse de cellules déficientes pour CD39 (Sun et al. 2010). En utilisant des souris chimériques, il a été démontré que les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques exprimant CD39 contribuent à l'échappement des cellules tumorales. Notamment l'expression de CD39 par les Tregs semble essentielle pour la croissance tumorale (Sun et al. 2010). Chez les souris transgéniques surexprimant CD39, on observe une croissance rapide des métastases hépatiques dérivées de la lignée cellulaire colorectale MC-26. En conséquence, l'injection intrasplénique de cellules MC-26 a produit des métastases hépatiques qui étaient significativement plus grandes chez ces animaux, soulignant encore le rôle de CD39 dans la croissance métastatique des tumeurs (Künzli et al. 2011). Le traitement avec POM1, un inhibiteur pharmacologique de CD39 a aussi significativement limité la croissance tumorale. La délétion de CD39 ou son inhibition directe supprime également de manière efficace l'angiogenèse tumorale dans plusieurs modèles (Feng et al. 2011; Jackson et al. 2007). La délétion

génétique de CD39 avec l'inhibition de l'angiogenèse entraîne une diminution de la croissance des tumeurs LLC et B16-F10 implantées tout en inhibant le développement de métastases pulmonaires. On observe donc une corrélation inverse entre l'expression de CD39 par les cellules tumorales, les lymphocytes infiltrants la tumeur, et l'immunité antitumorale ou l'angiogenèse.

1.2.3. CD39 dans les cancers humains

L'expression de CD39 par les tumeurs humaines et les cellules immunitaires infiltrants les tumeurs a été largement décrite. Dans certaines études, son expression a été proposé comme un marqueur pronostique. L'expression de CD39 est élevée dans le cancer pancréatique et préférentielle dans les éléments vasculaires et stromales (Künzli et al. 2007). Etonnamment, des taux élevés d'ARNm de CD39 dans les tissus sont corrélés à une meilleure survie à long terme après une résection tumorale (Künzli et al. 2007). Une étude ultérieure menée dans le cadre d'un carcinome colorectal humain a révélé une expression accrue de CD39 à la fois dans les tumeurs primaires et les métastases, bien qu'il ait été proposé que la combinaison de CD39 et CD73, plutôt que CD39 seul, puisse avoir une meilleure valeur pronostique (Zhang et al. 2019). Une autre étude a montré une expression élevée de CD39 dans les cellules myéloïdes de cancers ovariens. Ces cellules CD39⁺ sont capables de supprimer les LT effecteurs CD4⁺ *via* la génération d'adénosine, et ce phénomène est supprimé par le blocage de CD39 (Montalbán del Barrio et al. 2016). Dans le cadre des hémopathies malignes, les LT CD4⁺ et CD8⁺ CD39⁺ sont surreprésentés dans les lymphomes folliculaires par rapport aux ganglions lymphatiques normaux ou dans le sang périphérique (Hilchey et al. 2009). L'expression de CD39 est associée à la production d'adénosine qui joue un rôle inhibiteur sur l'immunité antitumorale effectrice. Chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, une forte expression de CD39 a été observée dans les LT CD4⁺ et CD8⁺ et était associée à un stade avancé de la maladie (Pulte et al. 2011).

1.2.4. CD73 dans l'immunité antitumorale

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de CD73 dans l'immunité antitumorale (Stagg et al. 2011; Yegutkin et al. 2011; Stagg et al. 2012; L. Wang et al. 2011). La déficience en CD73 est associée à un retard de croissance tumorale dans de multiples modèles de tumeurs transplantables, notamment le cancer du côlon MC-38, le lymphome EG7, les tumeurs ovariennes ID8, le mélanome B16-F10 et les tumeurs prostatiques TRAMP-C1 (Yegutkin et al. 2015; Stagg et al. 2010; Wang et al. 2011). En fonction du modèle, l'effet protecteur dépend des LT CD8⁺, des NK, ou de la sécrétion d'IFN- γ . Il a été démontré en utilisant des souris chimériques que l'expression hématopoïétique et non hématopoïétique de CD73 contribuait à l'échappement tumoral. Parmi les cellules hématopoïétiques, l'expression de CD73 sur les Tregs semble favoriser la croissance tumorale ce qui en accord avec le rôle immunosuppresseur de l'adénosine dérivée de CD73. En ce qui concerne le compartiment non hématopoïétique, l'expression de CD73 a été détectée sur les cellules endothéliales associées à la

tumeur, et associée à une réduction de l'expression d'ICAM-1. Il a été suggéré que CD73 limite le recrutement des LT vers la tumeur (Wang et al. 2011). Ceci semble cohérent avec une étude montrant que l'accumulation de LT CD8⁺ transférés a été augmentée à la fois dans la tumeur et dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur de souris déficientes en CD73. D'autres résultats suggèrent que CD73 dérivé de l'endothélium peut également réguler la migration des cellules tumorales à travers l'endothélium vasculaire.

1.2.5. CD73 dans les cancers humains

L'expression de CD73 dans le TME de divers types de cancers est au moins en partie due à l'hypoxie et à l'activation de facteurs de transcription HIF (Hatfield et al. 2014; Vaupel and Mayer 2016; Sitkovsky et al. 2014). Les voies de signalisation tumorales, telles que WNT, la transition épithélio-mésenchymateuse, les mutations de TP53 ou KRAS, le TGF- β , et la perte de la signalisation du récepteur à l'œstrogène, ont été associées à une augmentation de l'expression de CD73. En conséquence, l'adénosine dérivée de CD73 s'accumule dans le TME et exerce de multiples actions immunosuppressives pour altérer l'immunité antitumorale (Allard et al. 2016). L'expression de CD73 et son association avec les caractéristiques clinico-pathologiques ont été étudiées dans plusieurs types de cancers humains (Allard et al. 2016). Ces études démontrent qu'un haut niveau d'expression de CD73 dans le TME est associé à un plus mauvais pronostic. D'autres études ont identifié CD73 comme un marqueur de bon pronostic notamment dans le cancer du sein à bas grade (Supernat et al. 2012) et dans le carcinome endométrial (Bowser et al. 2016). La question de savoir si l'expression de CD73 reste de bon pronostic dans d'autres types de cancers ainsi que celle qui explique les raisons de ce rôle ambivalent de CD73, sont des questions importantes qui restent à élucider.

Des études récentes suggèrent que les concentrations sériques de la forme soluble de CD73 sont plus élevées chez les patients atteints de cancers par rapport aux individus sains. Une augmentation de formes solubles de CD73 dans le sang a également été rapportée chez des patients atteints de pancréatite inflammatoire aiguë (Maksimow et al. 2014). L'augmentation des niveaux de CD73 soluble dans le sang peut refléter l'inflammation tissulaire ou tumorale. Une autre hypothèse est que cette augmentation représente l'hypoxie tissulaire ou tumorale. En effet, il a été démontré récemment que les niveaux d'adénosine et de CD73 solubles sanguins sont induits chez des individus sains exposés à de hautes altitudes, qui entraînent l'hypoxie tissulaire (Liu et al. 2016).

1.2.6. Cibler CD39 et CD73 en tant que points de contrôle immunitaires

Etant donné le rôle central de CD39 dans la modulation négative de l'immunité antitumorale, au travers de la génération d'adénosine, les stratégies ciblant cette ectonucléotidase représenteraient une approche prometteuse dans l'immunothérapie du cancer. Cibler l'adénosine immunosuppressive

en inhibant CD39 peut restaurer les réponses immunitaires antitumorales ou booster l'efficacité d'autres thérapies antitumorales. Le blocage de l'activité de CD39 peut restaurer l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ et des NK après une coculture des PBMCs avec des cellules de mélanome *in vitro* (Shen et al. 2015). De plus, dans le contexte du lymphome folliculaire, le traitement avec un inhibiteur de CD39 ARL6715 ou avec des antagonistes spécifiques de A_{2A} ou de A_{2B} a permis de surmonter partiellement l'hypo-réponse des LT à la stimulation (Hilchey et al. 2009).

L'efficacité de POM1 dans le blocage de l'activité de CD39 a été démontré dans des modèles animaux. Son injection pendant 10 jours limite la croissance du mélanome B16 et de la tumeur colorectale MC-38 (Sun et al. 2010). De plus, l'effet obtenu avec POM1 était comparable à l'effet obtenu avec des animaux déficients pour CD39 et aucun signe de toxicité n'a pu être observé durant toute la durée du traitement.

Les tentatives visant à réduire les effets immunosuppresseurs de l'adénosine tout en renforçant les réponses antitumorales ont été orientées vers le développement d'anticorps monoclonaux anti-CD39. Deux anticorps monoclonaux anti-CD39, BY40 et BA54G ont été proposés pour bloquer l'activité enzymatique de CD39 (Bastid et al. 2013). Cet anticorps monoclonal BY40 peut induire une diminution de la modulation de CD39 à la surface d'une lignée cellulaire NK ainsi que sur les Tregs circulants, et diminue l'activité ATPase de CD39 sur les monocytes primaires *in vitro*. Cependant l'efficacité clinique de ces anticorps monoclonaux anti-CD39 n'a pas encore été évaluée.

En ce qui concerne CD73, les premières observations ont révélé que les anticorps monoclonaux anti-CD73 pouvaient renforcer les effets mitotiques de l'anticorps monoclonal anti-CD3 sur les LT humains. Il est intéressant de noter que cet effet était indépendant du substrat, ce qui rappelle ce qui a été observé après la réticulation d'autres protéines à ancrage GPI, comme CD90, CD48 et CD59 (Loertscher and Lavery 2002). Sitkovsky et collaborateurs ont ensuite découvert le rôle central du récepteur A_{2A} de l'adénosine dans la suppression de l'inflammation et ont démontré par la suite que les souris déficientes pour ce récepteur développent une immunité antitumorale accrue (Ohta and Sitkovsky 2001; Ohta et al. 2006). En s'appuyant sur l'observation que les souris déficientes en CD73 présentent également une immunité antitumorale accrue, des études de preuves de concept ont démontré le potentiel de la thérapie anti-CD73 dans le cancer (Stagg et al. 2010; Jin et al. 2010). Il a été démontré que le blocage de CD73 atténue l'immunosuppression médiée par l'adénosine et réduit les métastases (Yegutkin et al. 2011; Hay et al. 2016). Il a également été démontré que le ciblage de CD73 supprime la tumorigénèse indépendamment de ses effets de stimulation immunitaire. Par exemple, la délétion du gène CD73 dans les cellules tumorales humaines est associée à une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques (Zhi et al. 2010). L'expression de CD73 dans les cellules

tumorales augmente également de manière significative leur potentiel métastatique par un mécanisme qui ne dépend que partiellement de l'immunosuppression (Stagg et al. 2010). L'activation des récepteurs A_{2B} sur les cellules tumorales est probablement un mécanisme important par lequel l'adénosine favorise les métastases.

Le blocage ciblé de CD73 supprime également l'angiogenèse tumorale. Il a en effet été démontré que le traitement par anticorps monoclonal anti-CD73 réduit la densité des cellules endothéliales vasculaires présentes dans les tumeurs 4T1 (Allard et al. 2014). Les fonctions enzymatiques et non enzymatiques de CD73 semblent favoriser l'angiogenèse tumorale. L'activité de CD73 dépendante de l'adénosine stimule la production de VEGF et la signalisation FAK (*focal adhesion kinase*, protéine importante pour les phénomènes de migration cellulaire), tandis que l'activité de CD73 indépendante de l'adénosine favorise la formation de capillaires par les cellules endothéliales. D'autres études ont également suggéré un rôle de CD73 dans la promotion de l'adhésion des cellules tumorales aux protéines de la matrice extracellulaire. Par exemple, il a été démontré que CD73 favorise l'adhésion des cellules de mélanome à la Tenascin-C, un composant de la matrice extracellulaire, indépendamment de son activité enzymatique (Sadej et al. 2008).

Un anticorps monoclonal anti-CD73, MEDI9447, est actuellement évalué dans le cadre d'un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancer (NCT03611556). MEDI9447 se lie à un épitope discontinu dans le domaine N-terminal de CD73, ce qui entraîne une inhibition non-compétitive de son activité enzymatique (Geoghegan et al. 2016). Il a été démontré que MEDI9447 inhibe à la fois le CD73 lié à la membrane et le CD73 soluble. Les données de MedImmune suggèrent que MEDI9447 induit un pontage ou une réticulation des dimères de CD73, limitant ainsi son changement de conformation nécessaire à son activité. Cet anticorps bloque également CD73 lié à la surface cellulaire, vraisemblablement par le biais d'un encombrement stérique empêchant une rotation appropriée. Bien que MEDI9447 puisse bloquer le CD73 soluble et le CD73 membranaire, la forme préférentiellement inhibée dans le TME n'est pas connue. Un autre anticorps monoclonal anti-CD73 est en développement par Bristol Myers Squibb, cet anticorps inhibe l'activité enzymatique et provoque l'internalisation cellulaire (Boussemart et al. 2016). Ces 2 anticorps combinés avec le blocage de PD-1 a permis d'améliorer l'activité antitumorale par rapport à l'un ou l'autre de ces traitements dans des modèles de tumeurs syngéniques. Innate Pharma a également fait état d'un programme de recherche autour des anticorps anti-CD73. Les données présentées semblent indiquer que les anticorps anti-CD73 inhibant l'activité enzymatique pouvaient efficacement inverser la suppression des LT médiée par l'AMP *in vitro* (Giraudon Paoli et al. 2016). Corvus Pharmaceuticals et Arcus Biosciences ont également divulgué récemment des programmes d'inhibiteurs de CD73.

De Marchi et collaborateurs ont également démontré que le récepteur P2X7 est capable d'influencer l'ensemble de la voie de signalisation purinergique du TME en modulant la sécrétion d'ATP par les cellules immunitaires et tumorales, mais aussi en agissant par le biais de sa dégradation par des ectonucléotidases, CD39 et CD73, exprimées par différentes populations immunitaires, notamment les Tregs, les LT effecteurs et les DC (De Marchi et al. 2019). Il semble donc intéressant d'un point de vue thérapeutique de cibler cette voie notamment en ciblant à la fois P2X7 et l'inhibition des ectonucléotidases.

Les ectonucléotidases CD39 et CD73 semblent donc être de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des cancers, seuls ou en combinaison avec des ICI déjà existants ou les chimiothérapies.

2. Les souris déficientes pour P2X7 et les molécules pharmacologiques ciblant P2X7

2.1. Souris génétiquement modifiées pour P2X7

Pour étudier le rôle de P2X7 *in vivo*, plusieurs outils ont été développés, notamment des animaux génétiquement déficients pour P2X7, des inhibiteurs pharmacologiques et des anticorps spécifiques. Les souris déficientes pour P2X7 ont été largement utilisées pour étudier la fonction de P2X7 *in vivo* depuis la génération des deux premières souches déficientes pour P2X7 par Pfizer et Glaxo (Solle et al. 2001; Chessell et al. 2005). Comme décrit précédemment, il est apparu par la suite que les deux lignées ne sont pas équivalentes : la lignée Glaxo, dans lequel l'exon 1 est ciblé, exprime toujours le variant P2X7k sur les LT (Nicke et al. 2009; Taylor, Gonzalez-Begne, et al. 2009), tandis que la lignée Pfizer, dans laquelle l'exon 13 a été ciblé, peut potentiellement exprimer un variant tronqué dans la partie C-terminale, qui présenterait une fonctionnalité moindre (Masin et al. 2012). Cette situation pourrait expliquer les différences phénotypiques et fonctionnelles publiées ainsi que les résultats contradictoires obtenus dans les modèles de maladies utilisant ces deux lignées déficientes pour P2X7 (Chen and Brosnan 2006; Bartlett, Stokes, and Sluyter 2014). Cependant, de nouveaux modèles de souris déficientes issues d'une lignée floxée pour P2X7 générés par l'*European Mutant Mouse Archive* (EMMA) sont désormais disponibles et pourraient faciliter la réévaluation des fonctions de P2X7 *in vivo* dans différents modèles de maladies (Kaczmarek-Hajek et al. 2018; Faliti et al. 2019). Ces nouvelles lignées permettent également la génération de « *knock-out* » tissu-spécifique par croisement avec des souris transgéniques exprimant la recombinaise CRE visant certains tissus (Douguet et al. 2021).

2.2. Inhibiteurs pharmacologiques

Des inhibiteurs pharmacologiques de P2X7, comme le BBG et l'oATP, un inhibiteur irréversible, ont montré des effets thérapeutiques dans plusieurs modèles animaux, notamment l'EAE, la colite expérimentale, la douleur inflammatoire chez les animaux arthritiques et/ou la néphrite médiée par

les anticorps (Bartlett, Stokes, and Sluyter 2014; Arulkumaran, Unwin, and Tam 2011b; Matute et al. 2007; Dell'Antonio et al. 2002; Taylor, Turner, et al. 2009). Bloquer P2X7 par ces petites molécules inhibitrices a également montré son efficacité dans l'inhibition de la croissance tumorale dans plusieurs modèles tumoraux exprimant P2X7 (Adinolfi et al. 2012; Hattori et al. 2012). BBG et oATP sont plutôt bon marché mais manquent de spécificité et sont associés à des effets secondaires. Le développement d'antagonistes plus spécifiques par plusieurs sociétés pharmaceutiques a facilité l'évaluation et la confirmation du rôle de P2X7 dans ces maladies (Adinolfi et al. 2015; 2012; Bartlett, Stokes, and Sluyter 2014; Arulkumaran, Unwin, and Tam 2011a).

En général, les antagonistes des récepteurs P2X sont des molécules présentant plusieurs charges négatives capables d'interagir avec les résidus chargés positivement dans la poche de liaison à l'ATP. Les antagonistes des récepteurs P2X classiques sont par exemple des molécules polyanioniques de grande taille comme la suramine ou ses dérivés. Le nombre et la localisation des charges négatives dans la molécule influencent l'activité sur les différents récepteurs P2X. Outre les molécules décrites ci-dessus, les antagonistes compétitifs de P2X7 sont généralement des composés médicamenteux de petite taille et non chargés, comme les azoles disubstitués et les dérivés de cyanoguanidines (Honore et al. 2006; Nelson et al. 2006). Les premières molécules de cette série ont été développées par les laboratoires Abbott et consistaient en un ensemble de dérivés du tétrazole présentant un substituant phényle et un substituant benzyle (**Figure 17**). Parmi ces composés, la molécule A-438079 présente une concentration inhibitrice médiane de 0,23 et 0,32 μM sur les récepteurs P2X7 humains et de rat respectivement, dans les tests d'influx de calcium (Nelson et al. 2006). Les deux substituants ainsi que le noyau central du tétrazole ont été modifiés à l'aide de diverses stratégies et a conduit au développement de A-839977 avec une concentration inhibitrice médiane de 0,02-0,150 μM pour les récepteurs humains, de rat et de souris (Friedle, Curet, and Watters 2010). Ce composé est capable de bloquer la libération d'IL-1 β induite par un agoniste et de donner des effets anti-hyperalgésiques dans un modèle inflammatoire de la douleur chez la souris. Le premier dérivé de cyanoguanidine pertinent signalé dans la littérature comme antagoniste de P2X7 est le composé A-740003 (Honore et al. 2006) développé également par les laboratoires Abbott et présentant des concentrations inhibitrices médianes de 0,040 et 0,020 μM pour les récepteurs P2X7 de l'homme et du rat respectivement. Cette molécule s'est avérée sélective par rapport aux autres récepteurs P2 et s'est révélée efficace dans des modèles *in vivo* de douleur neuropathique, de neuroblastome et de mélanome (Adinolfi et al. 2015; Amoroso et al. 2015). Une optimisation supplémentaire de cette série de composés a conduit au développement du composé A-804598 montrant avec le test d'influx de Ca^{2+} , une concentration inhibitrice médiane de 0,0109 et 0,0089 μM pour les récepteurs humains et murins respectivement, et une bonne sélectivité par rapport aux autres récepteurs P2 (Donnelly-

Roberts, Namovic, Surber, et al. 2009). Les composés A438079 ont été décrits initialement comme des antagonistes compétitifs mais ont été reclassés dans les modulateurs allostériques négatifs dans l'étude de Karasawa en 2016 (Karasawa and Kawate 2016).

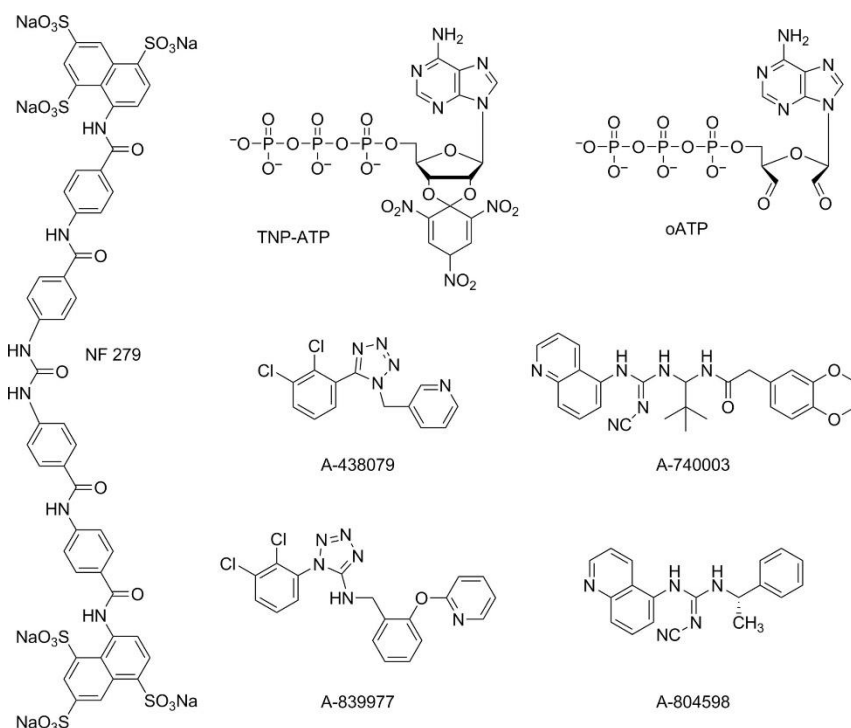


Figure 17 : Structure chimique des principaux antagonistes du récepteur P2X7. D'après (De Marchi et al. 2016).

2.3. Agonistes de P2X7

Les caractéristiques structurales et chimiques bien décrites de la poche de liaison à l'ATP du récepteur P2X7 rendent ce récepteur unique parmi les autres récepteurs P2X en ce qui concerne l'interaction avec les agonistes. Le ligand endogène, l'ATP, interagit avec les récepteurs P2X7 aux concentrations situées entre 0,1 et 3 mM tandis qu'il active les autres sous-types de récepteurs P2X à des concentrations au moins 100 fois plus faibles. Le BzATP, une molécule obtenue par modification de l'ATP, est l'agoniste de P2X7 le plus puissant développé à ce jour, avec une concentration effectrice médiane environ 10 fois plus faible que l'ATP. Cependant ce composé n'est pas sélectif, il active P2X1 et P2X3 avec des faibles concentrations de l'ordre du nanomolaire et les autres récepteurs P2X à des concentrations de l'ordre micromolaire. Le potentiel agoniste plus élevée du BzATP par rapport aux autres analogues de l'ATP a été interprétée à la lumière d'études de modélisation moléculaire, qui ont mis en évidence le rôle des résidus aromatiques comme Phe218 et Tyr288 dans l'interaction ligand-récepteur (Dal Ben et al. 2015). Les agonistes P2X généraux peuvent être classés selon leur potentiel agoniste au niveau du récepteur P2X7 comme suit : BzATP >> ATP > ATPγS > 2-MeSATP >> α,β-meATP. Malgré leur utilisation en tant qu'outils pharmacologiques pour analyser le rôle physiopathologique

du récepteur dans des modèles cellulaires et animaux, aucune de ces molécules n'est un ligand sélectif de P2X7 (Donnelly-Roberts, Namovic, Han, et al. 2009; Hibell et al. 2000; 2001)

2.4. Modulateurs allostériques

L'activité des récepteurs P2X peut être régulée par une variété de modulateurs allostériques parmi lesquels on peut compter les ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} (Coddou, Stojilkovic, and Huidobro-Toro 2011), des métabolites lipidiques (Bernier, Ase, and Séguéla 2013), des stéroïdes (De Roo, Rodeau, and Schlichter 2003) ou des molécule synthétiques. Ces molécules chimiques citées ci-après, sont capables de se lier au récepteur sur des sites différents de la poche de liaison à l'ATP, de modifier la conformation ou de stabiliser l'arrangement tridimensionnel de P2X7. Ils peuvent donc augmenter (modulateur allostérique positif) ou diminuer (modulateur allostérique négatif) l'effet du ligand endogène, l'ATP (Coddou et al. 2011; Evans 2009; Gunosewoyo and Kassiou 2010; Mehta et al. 2014; Muller 2015). L'avantage d'utiliser ces molécules en lieu et place des ligands orthostériques, est que les modulateurs allostériques modifient une fonction biologique en cours et que leur activité est donc spécifique du site et de l'évènement, alors que les ligands orthostériques entraînent une activation ou un blocage général du récepteur dans l'ensemble de l'organisme. De plus, les ligands allostériques sont généralement plus sélectifs car ils ne se lient pas à la poche de l'ATP commune aux récepteurs P2X mais agissent dans différentes régions du récepteur trimérique.

En général, les ligands synthétiques non compétitifs du récepteur P2X7 rapportés à ce jour sont des modulateurs allostériques négatifs et appartiennent à diverses classes structurales, certains exemples pertinents étant donnés par le BBG, AZD9056, KN-62, AZ-11645373, AZ-10606120, GW791343, GSK314181A, GSK1482160, CE-224,535, AFC-5128, JNJ-479655, et EVT-401 (**Figure 18**) (Alves et al. 2013; Friedle, Curet, and Watters 2010; Guile et al. 2009; Kaczmarek-Hajek et al. 2018; Mehta et al. 2014; Alan North and Jarvis 2013). Ces composants présentent un potentiel antagoniste de l'ordre du nanomolaire/micromolaire pour le récepteur P2X7.

D'autre part, on trouve des modulateurs allostériques positifs, potentialisateurs de l'activité de P2X7 tels que HEI-3090 (Douguet et al. 2021), LL-37 (Tomasinsig et al. 2008), la clemastine (Wolfgang Nörenberg et al. 2011), la polymixine B (D. Ferrari et al. 2007), l'ivermectine (W. Nörenberg et al. 2012), le tenidap (Sanz, Chiozzi, and Di Virgilio 1998) et les ginsenosides (Bidula et al. 2019).

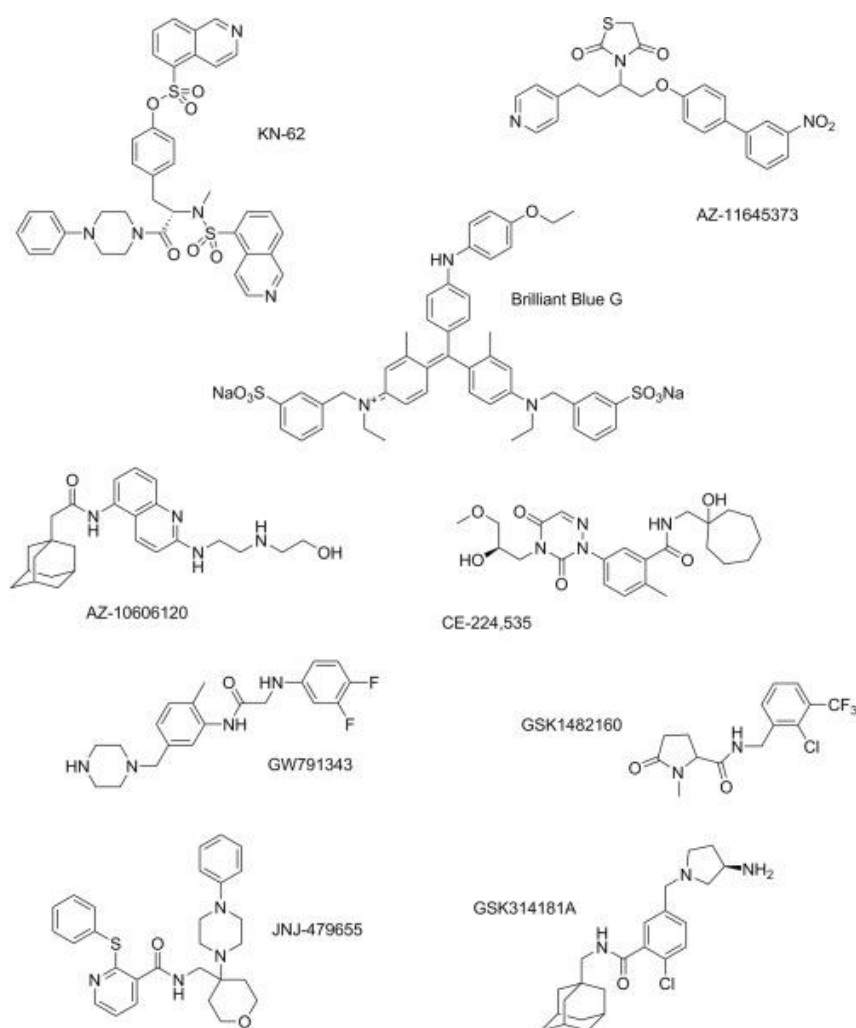


Figure 18 : Structure chimique des modulateurs allostériques de P2X7. D'après (De Marchi et al. 2016).

2.5. La signalisation purinergique comme cible thérapeutique

Les nucléotides extracellulaires et les récepteurs P2 sont considérés comme des cibles pharmacologiques prometteuses, mais les investissements dans le développement d'inhibiteurs spécifiques n'ont permis d'apporter de nouveaux médicaments que dans un très petit nombre de cas. Néanmoins, certaines applications cliniques solides ont été mises en œuvre au fil des ans, principalement dans le système cardiovasculaire. D'autres molécules sont en cours de développement et offrent des perspectives cliniques (**Table 5**).

Récepteur	Agoniste	Antagoniste	Applications cliniques	Potentielles applications cliniques
P2Y2	Diquafosol, Denufosol		Maladie des yeux secs	Mucoviscidose
P2Y6		TIM-38, MRS2578		Maladies cardiovasculaires, Obésité

P2Y12		Prasugel, clopidrogel, cangrelor, tricagrelor		Syndrome coronarien aiguë, Maladie coronarienne, Événements athérombotiques
P2X3		AF-353, AF-219 (Gefpixant), DT-111, BLU-5937	Toux chronique	Hypertension, Athérosclérose Bronchopneumopathie chronique obstructive, Toux chronique
P2X4		NC-2600, PSB15417, NP-1815-PX	Toux sèche	Toux, Douleur neuropathique
P2X7	HEI3090 (modulateur allostérique positif)			Cancer du poumon
		AZ10606120, A740003, DHTS GSK1482160, JNJ54175446, CE334535		Maladies de la rétine, Stade précoce de la tauopathie, Trouble dépressif, Polyarthrite rhumatoïde
nfP2X7		Anticorps		Carcinome basocellulaire

Table 5 : Récepteurs purinergiques et cibles thérapeutiques approuvées ou potentielles.. Récepteurs purinergiques, agonistes et antagonistes les ciblant, applications cliniques ainsi que les potentielles applications cliniques. D'après (Vultaggio-Poma et al. 2022).

3. Les inhibiteurs biologiques : anticorps et nanobodies

Les anticorps représentent une autre classe émergente de modulateurs pharmaceutiques utilisés pour bloquer ou potentialiser leurs cibles *in vivo*. Les anticorps ont évolué en molécules bifonctionnelles en forme de Y avec une architecture hétérotétramérique conservée composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes (H) et légères (L) identiques. Les régions C-terminales conservées des chaînes H appariées, formant le fragment cristallisable (Fc), servent de partie de reconnaissance pour déclencher divers processus effecteurs œuvrant à l'élimination de l'antigène. Chacune des régions N-terminales formant les régions Fab (fragment de liaison à l'antigène), comprend les deux domaines de la chaîne légère et les deux premiers domaines de la chaîne lourde. Les domaines variables à l'extrémité N-terminale des chaînes H et L présentent une grande variabilité de séquence. Dans chaque domaine V, trois courtes régions d'acides aminés forment les régions hypervariables correspondant aux boucles CDR1/CDR2/CDR3 impliquées directement dans la reconnaissance de l'antigène. Ces régions forment une surface continue qui constitue le paratope. Ce dernier est complémentaire à la surface de l'antigène, déterminant la complémentarité à l'antigène (CDR). Les deux boucles CDR3 des chaînes lourdes et légères présentent la plus grande variabilité de longueur et de séquence d'acides aminés. Les anticorps conventionnels sont des molécules de relativement grande taille autour de 150 kDa. En relation direct avec leur taille, leur biodistribution dans les tissus est limitée

(Li et al. 2016). Les anticorps sont généralement spécifiques de leur cible, plus facilement que les petites molécules pharmacologiques. Les anticorps ciblant les protéines membranaires, les cytokines et les facteurs de croissance sont déjà utilisés de manière thérapeutique en oncologie et dans l'inflammation. Des protéines plus petites, dérivées d'anticorps mais ne contenant que les domaines de liaison fusionnés directement *via* un linqueur (c'est-à-dire les deux domaines variables à des chaînes lourdes et légères pour former une chaîne unique constituée de ces deux fragments ou scFv) offrent de meilleures propriétés de biodistribution. Un type remarquable d'immunoglobulines, dépourvues de chaînes légères a été découvert chez le requin (Greenberg et al. 1995) et les camélidés en 1989 (Hamers-Casterman et al. 1993). Le système immunitaire adaptatif des camélidés est surprenant car une classe unique d'anticorps constituée seulement de chaînes lourdes (HCAbs), dépourvus de chaînes légères est produite parallèlement aux anticorps conventionnels. La reconnaissance de l'antigène par ces anticorps HcAbs dépend ainsi d'un domaine unique, appelé à l'origine VHH ou nanobody, en référence à ses dimensions nanométriques. Ces nanobodies offrent une alternative aux anticorps intéressante. Les nanobodies et les anticorps à chaînes lourdes présentent des spécificités et des affinités similaires à celles des anticorps classiques, mais leur taille est plus petite (15 kDa, 90 kDa respectivement) (**Figure 19**). Ces nanobodies ont la particularité d'avoir une grande solubilité (Tanha et al. 2001), une grande stabilité (Van Der Linden et al. 1999), ainsi qu'une facilité de production dans les bactéries ce qui permet une production à grande échelle. Leur petite taille confère aux nanobodies une excellente pénétration dans les tissus (Fang et al. 2018) notamment dans les tumeurs (Wesolowski et al. 2009; Muyldermans 2013; Bannas, Hambach, and Koch-Nolte 2017). Ils ont également une élimination rapide de la circulation avec un temps de demi-vie de moins de 30 minutes (Tijink et al. 2008). En raison de leurs caractéristiques uniques et de leur relative facilité de production, les nanobodies sont de plus en plus utilisés dans une variété d'applications, telles que l'administration de médicaments ou de radio-isotopes, ainsi que l'imagerie de tumeurs et d'autres types de tissus. La demi-vie des nanobodies peut être prolongée, par exemple, par modification chimique avec du polyéthylène glycol (Rashidian et al. 2019), par fusion du nanobody avec l'albumine (Altintas et al. 2013) ou avec un nanobody se liant à l'albumine (Tijink et al. 2008).

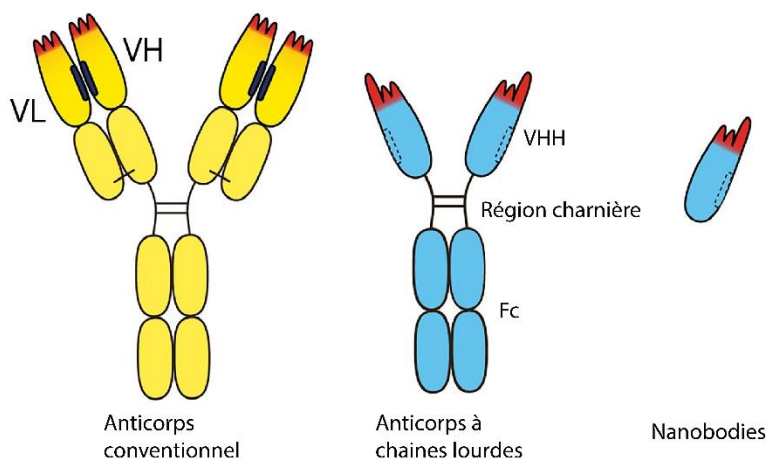


Figure 19 : Comparaison entre les anticorps conventionnels et les nanobodies.

Les anticorps conventionnels sont composés de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques entre elles, d'une région charnière et d'une partie Fc. Les anticorps à chaînes lourdes (HcAbs) ne comportent que les chaînes lourdes constituées du domaine VHH, de la région charnière et de la partie Fc. Tandis que les nanobodies ne sont composés que d'un fragment VHH. D'après (Koch-Nolte et al. 2019).

Un certain nombre d'anticorps monoclonaux et de nanobodies ont été développés pour moduler la fonction du récepteur P2X7 humain et murin (**table 6**). L'anticorps monoclonal L4 (Buell et al. 1998) est le premier anticorps généré de manière classique et dirigé contre le récepteur P2X7 humain. L'anticorps monoclonal 1F11 (Kurashima et al. 2012) inhibe le récepteur P2X7 murin. Tandis que l'anticorps monoclonal Hano43 empêche l'ADP-ribosylation de P2X7 de souris (Möller et al. 2007). Un ensemble de nanobodies modulant P2X7 a été sélectionné par *phage display* à partir de lamas immunisés avec des vecteurs plasmidiques codant pour le gène cible (immunisation génique), suivi d'un rappel de vaccination constitué de cellules HEK transfectées par P2X7 codant pour les récepteurs humains ou murins (Danquah et al. 2016). Le nanobody Dano1 (Danquah et al. 2016) inhibe la fonction du P2X7 humain. Le nanobody 13A7 inhibe la fonction du récepteur P2X7 de souris, tandis que le nanobody 14D5 le potentialise et permet son activation à des concentrations d'ATP dix fois plus faibles (Danquah et al. 2016). Ces anticorps ont montré une spécificité remarquable pour P2X7, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas montré de liaison détectable à P2X4 ou P2X1, les paralogues les plus proches de P2X7.

Anticorps monoclonal/nanobodies	Effet sur la fonction de P2X7	Effet biologique <i>in vivo</i> dans différents modèles inflammatoires
mAb L4	Inhibe l'activation de P2X7 chez l'homme et le rat	Inhibe la libération d'IL-1 β induite par l'ATP
mAb Hano43	Inhibe l'ADP-ribosylation de P2X7 chez la souris	

mAb Hano44	Potentiale l'activation de P2X7 chez la souris	
mAb 1F11	Inhibe l'activation de P2X7 chez la souris	Améliore la colite expérimentale
Nb Dano1	Inhibe l'activation de P2X7 chez l'homme	Inhibe la libération d'IL-1 β induite par l'ATP
Nb 13A7	Inhibe l'activation de P2X7 chez la souris	Améliore la glomérulonéphrite expérimentale et la dermatite de contact
Nb 14D5	Potentiale l'activation de P2X7 chez la souris	Aggrave la glomérulonéphrite expérimentale
Nb S+16	Inhibe l'ADP-ribosylation de P2X7 chez la souris	Améliore le diabète de type 1

Table 6 : Anticorps monoclonaux et nanobodies modulant la fonction de P2X7. Anticorps ou nanobodies, leurs effets sur la fonction de P2X7 ainsi que leurs effets biologiques évalués *in vivo* dans différents modèles inflammatoires. D'après (Koch-Nolte et al. 2019).

Dans notre étude, deux nanobodies ont été sélectionnés et utilisés pour moduler la fonction de P2X7 murin. Il est intéressant de noter que l'un d'entre eux, 13A7, bloque puissamment P2X7. Tandis que l'autre nanobody, 14D5, est un modulateur allostérique positif, il potentialise les activités de P2X7. Ces nanobodies ont été utilisés *in vivo* pour valider la fonction de P2X7 dans différents modèles murins afin d'évaluer le rôle de P2X7 dans la physiopathologie de ces maladies. Dans les études déjà publiées, l'administration systémique de 13A7 a réduit l'inflammation dans des modèles murins de dermatite allergique et de glomérulonéphrite. A l'inverse, 14D5 administré *in vivo* a aggravé les scores cliniques dans ces deux modèles expérimentaux (Danquah et al. 2016). L'administration répétée de ces nanobodies anti-P2X7 sélectionnés *in vivo* représente sans aucun doute un nouveau moyen d'étudier les fonctions de P2X7 dans différentes situations physiopathologiques.

4. La méthodologie AAV-nanobodies

4.1. Les AAV

4.1.1. Généralités

Les virus adéno-associés (*Adeno-associated virus*, AAV) ont été isolés pour la première fois en tant que contaminants de préparations d'adénovirus au milieu des années 1960 et identifiés peu après dans des tissus humains (As- et al. 1965). Les AAV appartiennent à la famille des *Parvoviridae* et au genre des Dependoparvovirus. Leur cycle de réplication est dépendant de la présence d'un virus auxiliaire tels que les Adénovirus, d'où son nom et sa classification taxonomique. Ils sont présents chez de nombreuses espèces vertébrées, y compris l'homme et les primates non humains. Le consensus actuel est que l'AAV ne cause aucune pathologie connue chez l'homme. Il est composé d'une capside

protéique icosaédrique d'environ 26 nm de diamètre et d'un génome monocaténaire d'environ 4,7 kb qui peut être le brin sens ou anti-sens. Le génome est flanqué aux extrémités de deux répétitions terminales inversées (ITRs) en forme de T qui servent en grande partie d'origine de réplication virale et de signal d'encapsidation. La capside comprend trois types de sous-unités, VP1, VP2 et VP3, totalisant 60 copies dans un rapport de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3). Les protéines sont identiques entre elles dans leur partie C-terminale et sont toutes codées par le gène *cap*. Le gène *rep* code pour quatre protéines nécessaires à la réplication virale nommées d'après leur masse moléculaire : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Le gène *cap* code en effet pour les trois sous-unités de la capside par épissage alternatif et à partir de codons d'initiation de la traduction différents. Un troisième gène qui code pour la protéine d'activation de l'assemblage (AAP), est contenu dans la séquence du gène *cap*, un cadre de lecture différent, et a été démontré favoriser l'assemblage des virions. En absence de virus *helper*, le génome du virus sauvage de sérotype AAV2 peut s'intégrer dans le génome humain au sein d'un locus précis connu sous le nom d'AAVS1 pour établir une latence. Ce phénomène est en partie dû à la similitude de séquence entre les séquences du locus AAVS1 et celles des ITRs de l'AAV2 (Wang, Tai, and Gao 2019). Cette intégration dépend néanmoins de la présence et de l'activité des protéines codées par le gène *Rep*.

4.1.2. Les AAV comme vecteur pour l'administration de gènes *in vivo*

Les AAV recombinants (rAAV) sont la principale plate-forme pour l'administration *in vivo* de thérapies géniques. En pratique, les rAAV sont composés de la même séquence et de la même structure de capside que celle des AAV sauvages. Cependant, les rAAV encapsident des transgènes dépourvus de toutes les séquences codantes pour les protéines de l'AAV sauvage et ont codent à la place pour les protéines thérapeutiques. Les seules séquences d'origine virale restantes sont les ITRs qui sont nécessaires pour l'encapsidation lors de la production du vecteur. L'élimination complète des séquences codantes virales contribue à leur faible immunogénicité et cytotoxicité lorsqu'ils sont administrés *in vivo*. Étant donné la limite imposée par leur petite taille, le transgène, de taille inférieure à 5,0 kb, doit être soigneusement conçu pour prendre en compte non seulement la séquence de la région codante mais aussi les éléments régulateurs nécessaires à l'expression du gène tels que les séquences promotrices, les éventuels introns et le signal de polyadénylation. Le tropisme des rAAV est en grande partie déterminée par les interactions moléculaires entre la capside et les récepteurs de surface des cellules cibles. Les sérotypes dominants sont censés reconnaître des récepteurs cellulaires distincts, tels que les glycoprotéines. Des corécepteurs participent également à cette interaction entre les rAAV et les cellules qu'ils transduisent et interviennent également dans leur internalisation.

L'interaction entre le rAAV et les récepteurs et corécepteur membranaire conduit à son internalisation par endocytose. Les particules de rAAV intactes se retrouvent alors dans les endosomes

et subissent une série de modifications structurales dépendantes du pH nécessaire à leur sortie de ces endosomes. Dans le cytosol, les particules circulent ensuite *via* le réseau cytosquelettique. Les rAAV entrent ensuite dans le noyau au travers du pore nucléaire où ils libèrent ensuite leur génome à l'intérieur du noyau après avoir subi une étape de décapsidation. Le trafic intracellulaire implique de multiples événements cellulaires se comportant chacun comme des freins s'opposant à l'efficacité de la transduction. Par conséquent l'identification des facteurs cellulaires clefs, et des mécanismes sous-jacents qui régulent ces processus, offrent un grand potentiel pour améliorer l'efficacité de la transduction. Par exemple, le génome monocaténaire du rAAV libéré dans le noyau n'est pas immédiatement prêt pour l'expression des gènes tant qu'il n'est pas converti en une forme bicaténaire, une condition nécessaire à la transcription, et une étape limitant son expression. Ainsi pour améliorer la transduction et l'expression du transgène, des rAAV contenant d'emblée le transgène sous forme bicaténaire ont été développés (scAAV, *self complementary AAV*). Ces scAAV montrent une cinétique plus précoce d'expression que les AAV classiques (ssAAV, *single stranded AAV*) (**Figure 20**). Par exemple, les vecteurs AAV2 *self complementary* (McCarty, Monahan, and Samulski 2001; Wang et al. 2003; McCarty et al. 2003), qui ont été mis au point pour court-circuiter la synthèse de l'ADN du second brin retardant l'expression du transgène, présentent une transduction accrue par rapport aux vecteurs AAV classiques dans le foie (McCarty, Monahan, and Samulski 2001; Wang et al. 2003; McCarty et al. 2003), les muscles (Wang et al. 2003), le cerveau (Fu et al. 2003), la rétine (Yang et al. 2002) et les cellules cancéreuses (Xu et al. 2005). Après cette étape de reconstitution du brin complémentaire, l'ADN double brin subit ensuite une circularisation par recombinaison génomique intramoléculaire ou intermoléculaire qui implique les ITRs. Ce processus de circularisation et de concatémérisation stabilise l'ADN transgénique sous une forme épisomale, qui favorise son expression et son maintien à long terme dans la cellule transduite. (**Figure 20**)

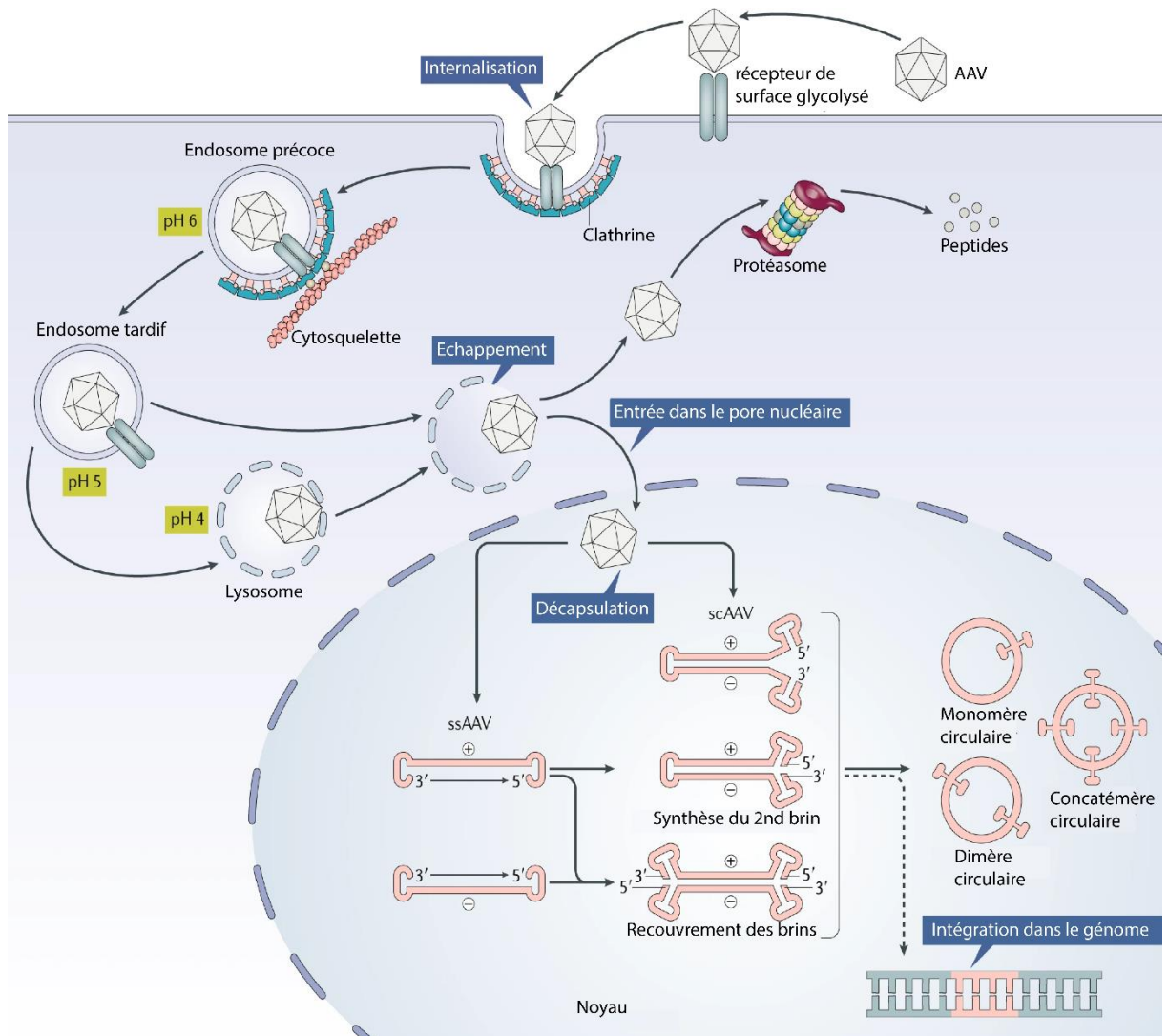


Figure 20 : Mécanismes impliqués dans la transduction lors de l'utilisation des vecteurs rAAV.

Les rAAV sont reconnus par certains récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles. Cela entraîne l'internalisation du vecteur *via* l'endocytose par les clathrines. En raison de l'environnement à pH acide de l'endosome, la région VP1/VP2 subit un changement conformationnel. Après l'échappement endosomal, les rAAV vont ensuite traverser le cytosol par le réseau cytosquelettique, puis ils subissent un transport dans le noyau et enfin une désencapsidation. Ils peuvent également subir une protéolyse par le protéasome. Deux classes de rAAV sont actuellement utilisées : les rAAV à brin unique (ssAAV) et les rAAV *self complementary* (scAAV). Les ssAAV sont encapsidés sous forme de génomes sens ou antisens. Ces formes simple brin sont encore inertes du point de vue transcriptionnel lorsqu'elles atteignent le noyau et doivent être converties en ADN double brin. Cette conversion peut être réalisée par la synthèse d'un second brin par les ADN polymérases de la cellule hôte ou par la recombinaison des brins sens et antisens qui peuvent exister dans le noyau. Comme les scAAV sont déjà bicaténaux par conception, ils peuvent immédiatement être transcrits. Les ITRs peuvent entraîner une recombinaison intra ou intermoléculaire pour former des génomes épisomiques circularisés qui peuvent persister dans le noyau. Les génomes des vecteurs peuvent également subir une intégration dans le génome de l'hôte à des fréquences très faibles. D'après (Wang, Tai, and Gao 2019).

4.1.3. Les sérotypes

Après la caractérisation du premier sérotype d'AAV, l'AAV2, en 1982 (Samulski et al. 1991), les vecteurs AAV2 ont rapidement gagné en popularité dans les applications de thérapie génique en raison de leur absence de pathogénicité, de leur large tropisme et de leur capacité à établir une expression du transgène à long terme. Les vecteurs AAV2 recombinants ont été testés dans des études précliniques pour diverses maladies telles que l'hémophilie, le déficit en α 1-antitrypsine, la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne et la polyarthrite rhumatoïde. Malgré la sûreté et l'efficacité bien établies des vecteurs AAV2 pour le transfert de gènes *in vivo*, plusieurs études suggèrent que les vecteurs AAV2, de large tropisme, ne répondent pas aux exigences d'une expression spécifique du transgène dans l'organe. Par conséquent, les efforts de recherche en cours dans ce domaine sont axés sur la modification des protéines de la capsid afin d'améliorer l'efficacité de transduction et/ou restreindre le tropisme des vecteurs AAV. Une autre piste consiste à caractériser et à évaluer d'autres sérotypes d'AAV.

A ce jour, douze sérotypes d'AAV (**Table 7**) sur la base d'une analyse phylogénétique et plus de cent variants ont été isolés à partir de stocks d'adénovirus ou de tissus humains et de primates non humains. Les sérotypes 1, 3, 4, 7, 8, 10 et 11 ont été isolés à partir de primates non humains et les sérotypes 2, 5, 6 et 9 à partir de tissus humains. Un sérotype par définition est un virus nouvellement isolé qui ne présente pas de réaction croisée efficace avec les sérums neutralisants spécifiques de tous les autres sérotypes existants et caractérisés. Sur cette base, seuls les AAV1 à 5 et les AAV7 à 9 pourraient être définis comme des vrais sérotypes. Les AAV6, 10 et 11 ne semblent pas correspondre à cette définition, puisque la sérologie de l'AAV6 est presque identique à celle de l'AAV1 (Gao et al. 2002; Gao et al. 2004; Grimm et al. 2003). Les expériences de pseudotypage indiquent que les protéines de la capsid sont exclusivement responsables du tropisme tissulaire (Rabinowitz et al. 2002; Grimm et al. 2006). Ainsi, les sérotypes présentent des tropismes différents en lien avec leurs récepteurs et corécepteurs avec lesquels ils interagissent préférentiellement.

L'utilisation de sérotypes d'AAV qui diffère de l'AAV2 initial, peut non seulement permettre de réduire la dose de vecteurs nécessaire, en raison de leur efficacité de transduction, mais aussi aider à échapper aux anticorps neutralisants préexistants générés par la réponse immunitaire humorale à la suite d'une infection naturelle vis-à-vis de l'AAV2 sauvage dont la séroprévalence est de l'ordre de 70%. En outre, les sérotypes et les variants d'AAV existants peuvent servir de modèles pour la conception de nouvelles protéines capsidiques capable de cibler certains tissus qui permettront d'élargir et de compléter la gamme actuelle de vecteurs AAV. De tels vecteurs, obtenu par exemple en insérant dans les protéines capsidiques des nanobodies dirigés contre CD38 ou P2X7, ont permis *in vitro* de cibler uniquement les cellules exprimant ces protéines à leur surface (Eichhoff et al. 2019).

Sérotyp	Origine	Tropisme
AAV1	Primate non humain	Muscles, système nerveux central, cœur, foie, poumons
AAV2	Humain	Cœur, système nerveux central, foie, poumons, rétine
AAV3	Primate non humain	Foie
AAV4	Primate non humain	Rétine, poumons, reins
AAV5	Humain	Rétine, système nerveux central, foie
AAV6	Humain	Cœur, foie, muscles, rétine
AAV7	Primate non humain	Foie
AAV8	Primate non humain	Muscles, cœur, système nerveux central, foie
AAV9	Humain	Cœur, système nerveux central, foie
AAV10	Primate non humain	Muscles, tissus myoblastiques
AAV11	Primate non humain	Muscles, tissus myoblastiques
AAV12	Primate non humain	Glandes salivaires, muscles

Table 7 : Tropisme des différents sérotypes des AAV. Tropisme des différents AAV et leur origine. D'après (Ling, Zhong, and Srivastava 2018).

Le premier produit de thérapie génique à base de rAAV, l'alipogene tiparvovec (Glybera) a été approuvé par l'agence européenne des médicaments pour traiter le déficit en lipoprotéine lipase en 2012 (Ylä-Herttuala 2012), tandis que l'approbation de voretigene neparvovec-rzyl (Luxturna), le premier produit de thérapie génique à base de rAAV autorisé aux États-Unis, a suivi 5 ans plus tard. Puis le Zolgensma, un AAV9, a été autorisé sur le marché en 2020 pour le traitement des patients atteints d'amyotrophie spinale.

4.2. La méthodologie AAVnano

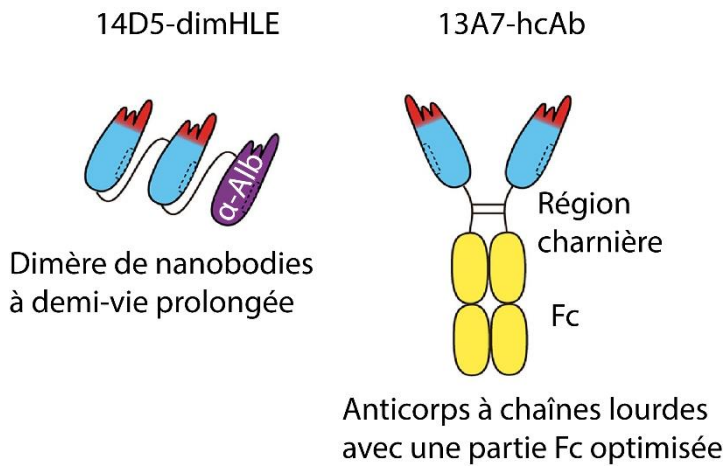


Figure 21 : Format des nanobodies utilisés dans cette étude.

Le nanobody 14D5 est un dimère de nanobodies couplé à un nanobody anti-albumine permettant de prolonger considérablement sa demi-vie. Le nanobody 13A7 est couplé à une partie Fc (IgG1 murine avec une mutation LSF) optimisée permettant d'augmenter la demi-vie des nanobodies et n'ayant pas de fonction effectrice. D'après (Koch-Nolte et al. 2019).

Nous avons utilisé pour notre étude des vecteurs AAV codant pour des nanobodies ciblant P2X7 afin d'étudier *in vivo* le rôle de ce récepteur, notamment en situation chronique. L'AAV permet de produire *in situ* des nanobodies anti-P2X7 dans le but de moduler durablement la fonction de P2X7 *in vivo*. Nous avons généré des vecteurs rAAV codant pour un anticorps bivalent à chaînes lourdes antagoniste de P2X7 appelé 13A7-hcAb (nanobodies 13A7 couplé aux domaines charnière et Fc d'une IgG1 de souris avec une mutation LSF) ou pour un dimère de nanobodies bivalent, à demi-vie prolongée, modulateur allostérique positif de P2X7, appelé 14D5-dimHLE (dimère de nanobodies 14D5 fusionné au nanobody spécifique de l'albumine Alb8) (**Figure 21**). Ces deux couplages à une partie Fc ou à un nanobody anti-albumine permettent d'augmenter considérablement la demi-vie des nanobodies (Danquah et al. 2016). Cette méthodologie, appelée AAV-nano, ne nécessite qu'une seule injection intramusculaire du vecteur AAV correspondant pour permettre l'expression systémique à long terme de ces nanobodies *in vivo* pendant au moins 120 jours. Cela permet d'éviter l'injection quotidienne de molécules pharmacologiques, d'anticorps ou de nanobodies nécessaire pour maximiser la modulation des fonctions de P2X7. Cette méthodologie offre la possibilité d'inhiber ou de potentialiser P2X7 dans des modèles chroniques tels que l'inflammation chronique, les maladies auto-immunes, la carcinogénèse ou la croissance tumorale. (**Figure 22**)

Les nanobodies sélectionnés dans cette étude ont été initialement décrits dans l'étude de Danquah et collaborateurs (Danquah et al. 2016). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que 13A7 et 14D5 étaient spécifiques du récepteur P2X7 murin et que 13A7 était le plus puissant antagoniste de P2X7 tandis que 14D5 était le potentialisateur le plus efficace dans des expériences de shedding de CD62L+, de patch clamp et dans des expériences de mesures de calcium. De plus, 13A7 permet de bloquer l'inflammation dans deux modèles *in vivo* expérimentaux. Dans un modèle de dermatite allergique de contact en réponse à l'allergène 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (DNFB), bloquer P2X7 *via* 13A7 améliorait l'inflammation locale, et cet effet thérapeutique nécessitait l'injection de 13A7 durant la phase de challenge suggérant un rôle de P2X7 dans les phases de sensibilisation et de challenge de la réponse inflammatoire. Dans le modèle de glomérulonéphrite expérimentale, les souris traitées avec 13A7 ont montré peu d'inflammation, voire aucune, tandis que les animaux traités par 14D5 ont présenté une inflammation et des lésions rénales accrues. Ces résultats montrent que la technologie des nanobodies peut générer des médicaments puissants et spécifiques contre les canaux ioniques, confirme que P2X7 est une cible thérapeutique pour les pathologies inflammatoires et caractérise un nouveau candidat médicamenteux puissant ciblant P2X7.

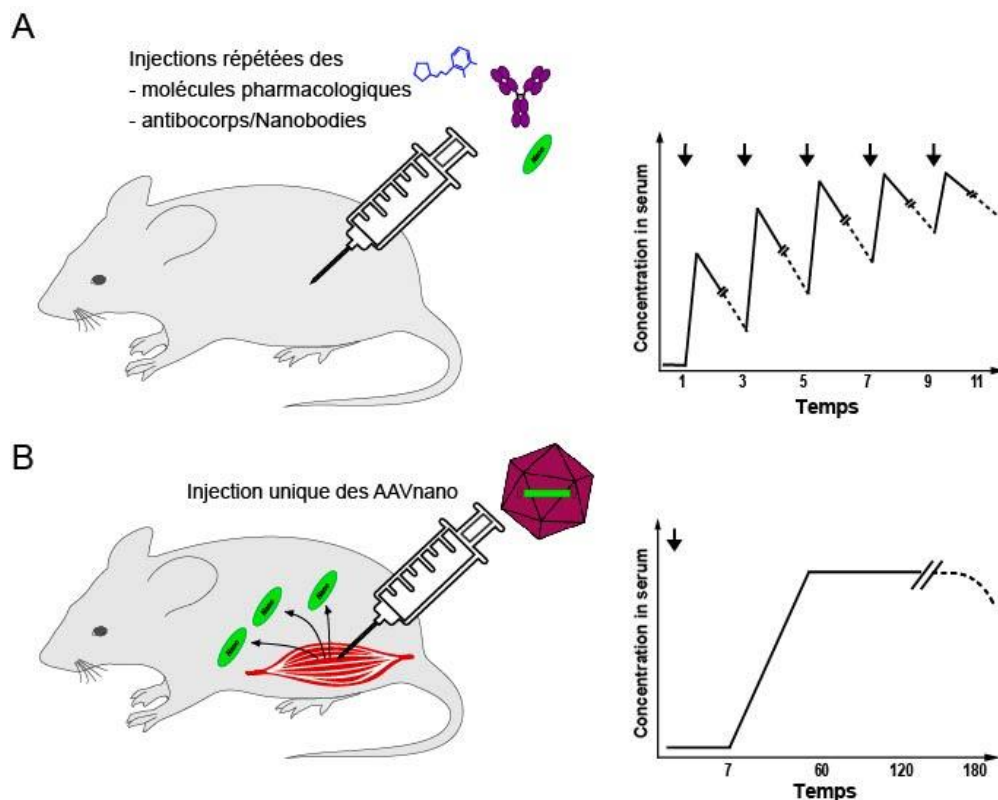


Figure 22 : Méthodologie AAVnano

La méthodologie AAVnano permet avec une seule injection intramusculaire des AAV codants pour le nanobody, la production *in situ* des nanobodies correspondants. Cela permet une production à long

terme du nanobody et évite les injections répétées de molécules pharmacologiques ou biologiques.
D'après (Demeules et al. 2020).

Objectifs de la thèse

Cette thèse avait pour objectif de valider la cible P2X7 dans les maladies inflammatoires aiguës et chroniques et dans le cancer en utilisant la méthodologie AAVnano.

Le premier objectif était de tester différentes constructions et différents formats de nanobodies afin de sélectionner les constructions et les formats permettant de bloquer d'une part et de potentialiser d'autre part, le plus efficacement, le récepteur P2X7. De plus, cet objectif permettait de tester la persistance des transgènes et le devenir des cellules transduites avec l'étude des réponses immunitaires anti-AAV et anti-transgène ainsi que le devenir des cellules et des récepteurs ciblés.

Le deuxième objectif était de valider la méthodologie AAVnano qui permet, au moyen d'une seule injection intramusculaire la production *in situ* de nanobodies antagonistes ou potentialisateurs de P2X7 à long terme dans les maladies inflammatoires aiguës et chroniques dans un modèle de colite. D'autre part, cette méthodologie a été étudiée dans le contexte de la carcinogénèse associée à la colite inflammatoire *via* l'ajout de l'azoxymethane (AOM) avant les cycles de DSS.

Le troisième objectif était de valider la cible P2X7 dans le cancer en utilisant la méthodologie AAVnano dans des tumeurs exprimant ou non le récepteur purinergique P2X7. D'une part en ciblant l'activité du récepteur P2X7 directement et d'autre part en déplétant les cellules cibles *via* des constructions portant une partie Fc capable d'activer les fonctions effectrices. Par la suite cette dernière méthodologie permettra de cibler par des constructions bispécifiques des cibles protumorales telles que P2X7, CD39, CD73 ou PD-L1.

Le quatrième objectif était d'étudier la combinaison de la méthodologie AAVnano avec une chimiothérapie conduisant à la mort immunogénique d'une part, et avec des AAVnano ciblant des points de contrôle immunitaires tels que PD-L1 et CD73, un autre membre de la signalisation purinergique, d'autre part. nous avons également testé une construction bispécifique CD73/PD-L1 dans le contexte tumoral.

Résultats

Article 1, Chapitre :

Development of Antibody and Nanobody Tools for P2X7

Tobias Stahler, Welbeck Danquah, Melanie Demeules, Henri Gondé, Romain Hardet, Friedrich Haag, Sahil Adriouch, Friedrich Koch-Nolte, and Stephan Menzel

Dans ce chapitre, nous avons réalisé des protocoles pour développer des anticorps et des nanobodies reconnaissant P2X7 sous sa conformation native à la surface cellulaire. Notamment l'immunisation des animaux, la génération et la production d'anticorps et de nanobodies spécifiques de P2X7. Nous avons également décrit l'ingénierie des nanobodies en dibodies et en anticorps à chaînes lourdes (hcAbs) et la production *in vivo* des nanobodies et hcAbs.

De plus, nous avons décrit l'utilisation de vecteurs viraux recombinants adéno-associés (rAAV) codant pour des nanobodies et des anticorps spécifiques de P2X7 comme nouveaux outils (que nous avons appelés AAVnano) pour évaluer la contribution de P2X7 *in vivo* dans différents modèles physiopathologiques.

Metadata of the chapter that will be visualized online

Chapter Title	Development of Antibody and Nanobody Tools for P2X7	
Copyright Year	2022	
Copyright Holder	The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature	
Author	Family Name	Stähler
	Particle	
	Given Name	Tobias
	Suffix	
	Division	Institute of Immunology
	Organization	University Medical Center Hamburg-Eppendorf
	Address	Hamburg, Germany
Author	Family Name	Danquah
	Particle	
	Given Name	Welbeck
	Suffix	
	Division	Institute of Immunology
	Organization	University Medical Center Hamburg-Eppendorf
	Address	Hamburg, Germany
Author	Family Name	Demeules
	Particle	
	Given Name	Melanie
	Suffix	
	Division	UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies (PANTHER)
	Organization	Normandie University
	Address	Rouen, France
Author	Family Name	Gondé
	Particle	
	Given Name	Henri
	Suffix	
	Division	UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies (PANTHER)
	Organization	Normandie University
	Address	Rouen, France
Author	Family Name	Hardet
	Particle	

	Given Name	Romain
	Suffix	
	Division	UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies (PANTHER)
	Organization	Normandie University
	Address	Rouen, France
Author	Family Name	Haag
	Particle	
	Given Name	Friedrich
	Suffix	
	Division	Institute of Immunology
	Organization	University Medical Center Hamburg-Eppendorf
Author	Address	Hamburg, Germany
	Family Name	Adriouch
	Particle	
	Given Name	Sahil
	Suffix	
Corresponding Author	Division	UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies (PANTHER)
	Organization	Normandie University
	Address	Rouen, France
	Family Name	Koch-Nolte
	Particle	
Author	Given Name	Friedrich
	Suffix	
	Division	Institute of Immunology
	Organization	University Medical Center Hamburg-Eppendorf
	Address	Hamburg, Germany
	Email	nolte@uke.de
Author		
	Family Name	Menzel
	Particle	
	Given Name	Stephan
	Suffix	
	Division	Institute of Immunology
Abstract	Organization	University Medical Center Hamburg-Eppendorf
	Address	Hamburg, Germany

Antibodies that recognize the ATP-gated P2X7 ion channel are established research tools. Nanobodies correspond to the antigen-binding variable immunoglobulin domain (VHH) of heavy chain antibodies that naturally occur in camelids. Nanobodies display better solubility than the variable domains (VH) of conventional antibodies. Therefore, it is much easier to construct bivalent and multivalent fusion proteins with nanobodies than with VH domains or with paired VH-VL domains. Moreover, nanobodies can bind functional crevices that are poorly accessible to conventional VH-VL domains. This makes nanobodies particularly well suited as functional modulators. Here we provide protocols to raise antibodies and nanobodies against mouse and human P2X7 using cDNA-immunization. This approach evokes antibodies and nanobodies that recognize the P2X7 ion channel in native conformation, some of which inhibit or potentiate gating of P2X7 by extracellular ATP. Furthermore, we developed protocols for producing P2X7-specific nanobodies and antibodies in vivo using rAAV vectors (AAVnano). This approach can be used either to durably inhibit or potentiate P2X7 function in vivo, or to deplete P2X7-expressing cells.

Keywords (separated by '-')	P2X7 - Monoclonal antibodies - Nanobodies - VHH - Heavy chain antibodies - Immunization - Phage display - Purinergic signaling

Development of Antibody and Nanobody Tools for P2X7 2

Tobias Stähler, Welbeck Danquah, Melanie Demeules, Henri Gondé, 3 AU1
Romain Hardet, Friedrich Haag, Sahil Adriouch, Friedrich Koch-Nolte, 4
and Stephan Menzel 5

Abstract 6

Antibodies that recognize the ATP-gated P2X7 ion channel are established research tools. Nanobodies 7
correspond to the antigen-binding variable immunoglobulin domain (VHH) of heavy chain antibodies that 8
naturally occur in camelids. Nanobodies display better solubility than the variable domains (VH) of 9
conventional antibodies. Therefore, it is much easier to construct bivalent and multivalent fusion proteins 10
with nanobodies than with VH domains or with paired VH-VL domains. Moreover, nanobodies can bind 11
functional crevices that are poorly accessible to conventional VH-VL domains. This makes nanobodies 12
particularly well suited as functional modulators. Here we provide protocols to raise antibodies and 13
nanobodies against mouse and human P2X7 using cDNA-immunization. This approach evokes antibodies 14
and nanobodies that recognize the P2X7 ion channel in native confirmation, some of which inhibit or 15
potentiate gating of P2X7 by extracellular ATP. Furthermore, we developed protocols for producing P2X7- 16
specific nanobodies and antibodies in vivo using rAAV vectors (AAVnano). This approach can be used either 17
to durably inhibit or potentiate P2X7 function in vivo, or to deplete P2X7-expressing cells. 18

Key words P2X7, Monoclonal antibodies, Nanobodies, VHH, Heavy chain antibodies, Immuniza- 19
tion, Phage display, Purinergic signaling 20
21

1 Introduction 22

Membrane protein-specific antibodies are commonly generated 23
from an animal immunized with the target antigen. The choice 24
and formulation of the antigen as well as the choice of the immu- 25
nized animal species determine the epitopes that will be recognized 26
by the induced antibodies [1, 2]. If an antibody for Western blot 27
analyses is needed, a linear epitope, for example, e.g., the C-terminal 28
peptide of the target protein conjugated to a carrier protein, is used 29
as immunogen, as the antigen is denatured during SDS-PAGE in 30

Sahil Adriouch, Friedrich Koch-Nolte, Stephan Menzel share senior authorship.

AU2

preparation for Western blot analysis. If an antibody is needed for flow cytometry or therapeutic applications, that is, to detect the cell surface protein in native conformation, the antigen should also be natively folded for immunization [3]. However, recombinant production and purification of membrane proteins is often challenging, especially for multimeric and multispan-transmembrane proteins. These limitations can be bypassed using transfected cells and/or genetic immunization. For mammalian membrane proteins such as P2X7, the degree of similarity/difference of the immunogen to the (P2X7) orthologue of the species immunized will influence which epitopes are preferentially addressed by the induced antibodies [2], that is, immunization typically induces antibodies that recognize epitopes in which the two species orthologues differ and only rarely antibodies against conserved epitopes.

A method that we have successfully used for raising antibodies against P2X7 and other membrane proteins is ballistic cDNA immunization using a gene gun [2–4]. Here, a cDNA expression vector for P2X7 is coupled to micrometer gold particles and propelled by gas pressure into the skin of the animal. Transfected skin cells and resident antigen-presenting cells then express P2X7 in native conformation on their surface. Surrounding cells damaged by the immunization procedure can release DAMPs (danger associated molecular patterns), and thereby promote a sterile inflammatory milieu. In addition, coimmunization with a cDNA expression vector encoding an immunostimulatory cytokine such as macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) can increase the antibody response to the antigen [2].

In addition to the conventional tetrameric IgG1 antibodies, llamas and other camelids produce IgG2 and IgG3 antibodies that are composed only of heavy chains [5–7] (Fig. 1). In these heavy chain antibodies (hcAb), the heavy chain also lacks the CH1 domain that mediates covalent binding of the light chain in conventional IgG antibodies [8]. Conventional antibodies bind their cognate antigen via a pair of variable domains of the heavy (VH) and light (VL) chains. In contrast, the antigen binding domain of hcAbs is composed of only one domain, the variable domain of the heavy chain of hcAbs, termed VHH or nanobody. While VH and VL domains contain a hydrophobic interface, the corresponding region of VHHs is composed of hydrophilic amino acids, leading to an increased solubility and stability of VHHs compared to conventional VHs or paired VH-VL domains. This higher solubility and stability accounts for a key advantage of VHH - their easy modular formatibility [5–7]. Two and more nanobodies can be linked like beads on a string to form homomeric or heteromeric multimers. Homodimeric nanobodies show increased binding strength (avidity) to their target. Bi- or multispecific constructs linking two or more nanobodies that bind distinct proteins can be used to increase the half-life of the construct, to connect

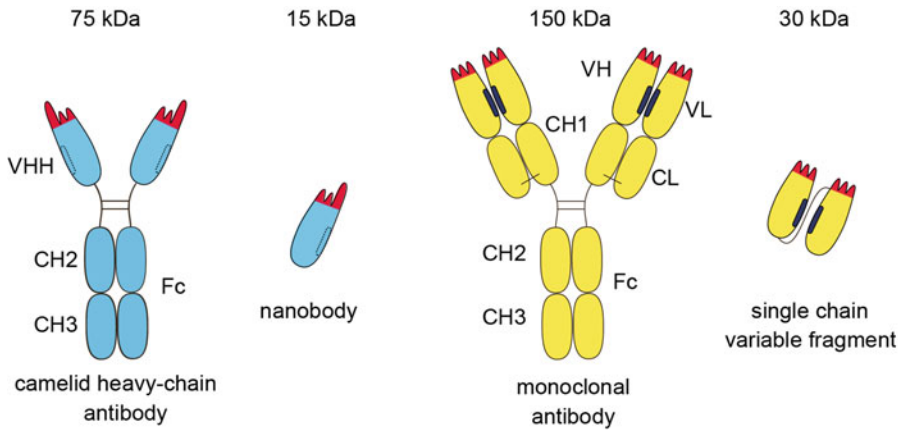


Fig. 1 Schematic diagram of heavy chain antibodies and conventional monoclonal antibodies. The target-binding module of hcAbs is composed of a single variable immunoglobulin domain, designated VHH or nanobody. A hydrophilic surface (indicated by dashed ovals) renders VHHs highly soluble. The target-binding module of mAbs is composed of a pair of VH and VL domains whose proper orientation is mediated by a hydrophobic interface (indicated by black ovals) and a disulfide-bond linking the CL and CH1 domains (black line). A pair of VH and VL domains can be linked genetically into a single-chain variable fragment (scFv) in which the orientation of domains is mediated alone by the hydrophobic interface between the two V domains. The three complementarity determining regions (CDR loops) are indicated in red. (Reproduced under the CC-BY license (Bannas et al. *Frontiers in Immunology* Vol. 8 November 2017, Fig. 1))

tumor cells with T cells or NK cells, or to connect to distinct membrane proteins on the cell surface.

Monomeric and dimeric nanobodies have a size of ~15 kD and ~30 kD respectively and thus, are readily excreted from the body via renal filtration. The serum half life can be increased by fusing nanobody monomers or dimers to the hinge, CH2 and CH3 domains of IgG (the fragment crystallizable (Fc) domains of an antibody), thereby reconstituting a heavy chain antibody format of ~90 kD and ~120 kD respectively [9, 10]. Depending on the chosen IgG isotype, the Fc region can be used to promote serum half life and/or depletion of the cells expressing the target antigen in vivo or to enable detection by a secondary antibody in vitro. Alternatively, the half life can be increased by fusing the nanobody monomer or dimer to an additional nanobody directed against serum albumin [4]. Nanobodies can also function as binding modules for chimeric antigen receptors or for AAV-gene therapy vectors [11, 12].

Several P2X7 antibodies and nanobodies, including the ones described here, are available from commercial sources. Peptide-specific antibodies (e.g., Alomone #APR-008, Abcam ab93354) generally work well in Western-blot analyses, but often fail to detect native P2X7 on the cell surface, for example, by flow cytometry, and are not recommended for immunoprecipitation. Monoclonal antibodies recognizing native human P2X7 generally work well in flow

cytometry and immunoprecipitation but not in Western-blot analyses: mouse P2X7-specific mAb Hano43 [3] is available from Bio-Rad and Enzo; mAb 1F11 [13] is available from biolegend and bdbioscience, human P2X7-specific mAb L4 [14] is available from the Developmental Studies Hybridoma Bank. The sequences of mouse P2X7-specific and human P2X7-specific nanobodies are listed in patents WO2010070145 and WO2013178783, respectively. The DNA sequences encoding these nanobodies can be obtained as synthetic DNA (“gene blocks”), cloned into a cDNA expression vector, and produced as recombinant proteins for research purposes. The use of these nanobodies for commercial purposes is subject to an appropriate license. Expression constructs can also be used to generate rAAV vectors encoding nanobodies or nanobody-based hcAbs to transduce cells and tissues in vivo. This in turn, represents a novel method to durably produce these constructs to modulate (i.e., inhibit or potentiate) P2X7 function in vivo or to deplete P2X7-expressing cells.

In this chapter, we provide protocols to develop antibodies and nanobodies which recognize P2X7 in its native confirmation on the cell surface. In addition, we describe the use of recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors encoding P2X7-specific nanobodies and hcAbs as new tools (that we termed AAVnano) to evaluate the contribution of P2X7 in vivo in different pathophysiological models [15].

2 Materials

2.1 Expression Vector Cloning and Cell Transfection

1. Mammalian expression plasmid (e.g., pcDNA3).
2. Open reading frames of mouse or human P2X7 (*see Note 1*) and GFP with nuclear localization motif.
3. Immortalized cells lines: HEK293-T and CHO for antigen presentation, HEK-6E for antibody production (*see Subheading 3.6.*)
4. Trypsin-EDTA: 0.25% pancreatic trypsin, 0.02% EDTA in PBS.
5. F17 complete: Freestyle F17 expression medium, 1% FCS, 4 mM L-Glutamin, 25 µg/mL geneticin, sterile filtered.
6. DMEM complete: Dulbecco’s modified essential medium, 5% FCS, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 1× nonessential amino acids, sterile filtered.
7. PEI stock solution: 0.32 mg/mL polyethylenimin in ddH₂O, sterile filtered.
8. 150 mM NaCl solution: 9 g/L NaCl in ddH₂O, sterile filtered.

2.2 Immunization of Rodents and Llamas

1. Mouse or human P2X7 mamalian expression plasmid cloned as described in Subheading 3.1.	144
2. Competent <i>E. coli</i> .	146
3. Plasmid preparation kit.	147
4. 10 mM Tris-EDTA solution.	148
5. 0.05 M spermidine solution.	149
6. 1 M CaCl ₂ solution.	150
7. Gold particles 1.0 μm.	151
8. 100% Ethanol.	152
9. 0.1 mg/mL Polyvinylpyrrolidone (PVP; MW 360,000) in ethanol,	153
	154
10. Tefzel tubing.	155
11. 20 mL Syringe.	156
12. Ultrasonic bath.	157
13. Tubing cutter.	158
14. Nitrogen gas supply.	159
15. Silicia dry packs.	160
16. Helios [®] Gene Gun System.	161
17. Helium gas supply.	162
18. Surgical clippers.	163
19. Mild depilatory cream.	164
20. Anesthesia equipment (e.g., isoflurane).	165
21. Llama glama, 1–2 years of age.	166
22. Rats (Lewis, 4–10 month of age).	167
23. Rabbits (New Zealand White, 6–12 month of age).	168
24. Mice (BALB/c, 3–9 month of age).	169
25. 4 mm lancet.	170
26. 19–23 gauge butterfly needle.	171
27. CHO cells.	172
28. 96-well flat bottom plates.	173
29. R-phycoerythrin (R-PE)- or Allophycocyanin (APC)-conjugated, species specific secondary antibodies.	174
	175
30. Hoechst stock solution: 10 mg/mL Hoechst 33342 in ddH ₂ O.	176
	177
31. Phosphate Buffered Saline (PBS+/+), 1× solution pH 7.4, with 0.9 mM CaCl ₂ and 0.5 mM MgCl ₂ .	178
	179
32. PFA solution: 1% PFA in PBS +/+.	180
33. DMEM complete.	181

2.3 Generation of P2X7-Specific Monoclonal Antibodies

1. P2X7-expressing cells generated as described in Subheading 3.1. 182
183
2. Anesthesia equipment (e.g., isoflurane). 184
3. 20–25 G Cannulas. 185
4. Syringes. 186
5. Sterile dissection instruments. 187
6. Phosphate Buffered Saline (PBS–/–), 1× solution pH 7.4, without Ca^{2+} and Mg^{2+} . 188
189
7. Cell strainer, 70- μM . 190
8. Sterile 96-well flat plates. 191
9. SP2/0-Ag14 mouse myeloma cells (ATCC 1581). 192
10. 50% (w/v) polyethylene glycol (PEG 3350) in DMEM. 193
11. 50× Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (HFCS). 194
12. HAT (50×): 5 mM hypoxanthine, 20 μM aminopterin, 0.8 mM thymidine. 195
196
13. RPMI complete: RPMI 1640 medium, 5% FCS, 1× HFCS, 1 mM Na-pyruvate, 5 mM L-glutamine (± 50 $\mu\text{g/L}$ gentamycin). 197
198
199
14. HAT-medium: 1× HAT, 24 μM β -mercaptoethanol, 50 $\mu\text{g/L}$ gentamycin in RPMI complete. 200
201
15. Freezing medium: 45% RPMI complete, 45% FCS, 10% DMSO. 202
203

2.4 Generation of P2X7-Specific Nanobodies

1. P2X7-expressing cells generated in Subheading 3.1. 204
2. Aldehyde-activated agarose beads. 205
3. Phosphate Buffered Saline (PBS–/–), 1× solution pH 7.4, without Ca^{2+} and Mg^{2+} . 206
207
4. Lysing solution: PBS, 1% Triton X-100, 1 mM AEBSF. 208
5. Tubes with anticoagulant to collect blood (1.5 mg EDTA/mL of blood). 209
210
6. Ficoll-paque PLUS solution. 211
7. RNA preparation kit. 212
8. Superscript III reverse transcriptase (200 U/ μL). 213
9. RNaseOut, recombinant ribonuclease inhibitor (40 U/ μL). 214
10. Random hexamer oligonucleotide primer [d(n)6] (50 μM). 215
11. dNTP mix 50×: dATP, dGTP, dTTP und dCTP (10 mM each). 216
217
12. 10 μM PCR primer solutions (*see* Table 1). 218
13. Q5 high-fidelity DNA polymerase (2000 U/mL) and 10× Cutsmart buffer. 219
220

Table 1
List of forward (f) and reverse (r) primers to amplify VHHs

Name	5'→3' Sequence	Usage
f.VHH	GGCTGAGCTGGGTGGTCCTGG	Amplify VHH from cDNA
r.CH2	GGTACGTGCTGTTGAAGTGTTC	Amplify VHH from cDNA
f.VHH-SfiI	CATTTGAGTTGGCCTAGCCGGCCATGGCAGAGG TGCAATTGGTGGAGTCT	Add a 5' SfiI site
r.VHH-NotI	ATGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGA	Add 3' NotI site
r.VHH1-20GS	ACCCGGATCCCCCGCCACCGCTGCC TCCACCGCCGCTACCCCGCCACCGCTGCC TCCACCGCCCGAGGAGACGGTGAC	Add a C-terminal 20GS linker and a 3' BamHI site
f.VHH2-15GS	TCTTGGATCCGGCGGGGGAGGTAGTGGGGG TGGGGGCTCAGGTGGCGGCGGCTCAA TGGCAGAGGTGCAGCTG	Add an N-terminal 15GS linker and a 5' BamHI site
LMB3	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequence nanobody in pHEN2

14. Agarose gel: 1× TAE buffer, 1.0% (w/v) agarose, 1:10,000
ROTI®GelStain.
15. PCR clean up kit.
16. Restriction enzymes: SfiI, NotI-HF, BamHI (20 U/μL each).
17. pHEN2 phagemid vector (c-terminal 6×His, Myc tag),
18. T4 DNA ligase (400 U/mL) and 10× ligation buffer.
19. Electrocompetent TG1 *E. coli*.
20. Electroporation cuvettes (0.1 cm gap).
21. Electroporator MicroPulser.
22. Recovery medium (supplied by manufacturer of electrocompe-
tent TG1 cells).
23. LB-carb plates: LB-Agar, 100 μg/mL carbenicillin.
24. LB-carb-glu plates: LB-Agar, 100 mM glucose, 100 μg/mL
carbenicillin.
25. 2×YT medium: 16 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L
NaCl, pH 7.0.
26. 2×YT-kana plates: 2×YT medium, 15 g/L bacto agar, 50 μg/
mL kanamycin.
27. 2×YT-kana-carb medium: 2×YT medium, 50 μg/mL kanamy-
cin, 100 μg/mL carbenicillin.
28. 2×YT freezing medium: 2×YT medium, 100 μg/mL carbeni-
cillin, 20% glycerol.

29. M13K07 helper phage at $>10^{11}$ plaque forming units/mL.	243
30. PEG/NaCl (5×): 20% (w/v) polyethylene glycol 6000, 2.5 M NaCl.	244 245
31. Phosphate Buffered Saline (PBS–/–), 1× solution pH 7.4, without Ca^{2+} and Mg^{2+} .	246 247
32. Untransfected and P2X7-transfected HEK293 cells in DMEM.	248
33. Blocking Buffer: PBS with 2% (w/v) BSA.	249
34. Trypsin-EDTA: 0.25% pancreatic trypsin, 0.02% EDTA in PBS.	250 251
35. AEBSF solution: 7.5 mg/mL 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) in PBS.	252 253

2.5 P2X7-Specific Nanobody Production and Verification

1. 2×YT-carb-glu medium: 16 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, pH 7.0, 100 µg/mL carbenicillin, 2% glucose.	254 255 256
2. 2×Y-carb-glu plates: 2×YT-carb-glu medium, 15 g/L bacto agar.	257 258
3. Plasmid mini preparation kit.	259
4. HB2151 <i>E. coli</i> .	260
5. Sequencing primer LMB3 (<i>see</i> Table 1).	261
6. IPTG: 100 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside stock solution.	262 263
7. PP (periplasma) lysis buffer: 20% (w/v) sucrose, 30 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM AEBSF, 100 µg/mL lysozyme.	264 265
8. Syringe filters (0.45 µm).	266
9. 2×YT freezing medium: 2×YT-carb-glu medium, 20% glycerol.	267 268
10. Precast mini 10% polyacrylamide gels (Bis-Tris) and SDS-PAGE apparatus and buffers.	269 270
11. Molecular weight marker: 100 ng lysozyme (16 kD), 750 ng IgG (150 kD), 1 µg BSA (66 kD) in 10 µL PBS. 750 ng IgG (150 kD) separates into two bands under reducing conditions: 500 ng (50 kD) and 250 ng (25 kD).	271 272 273 274
12. FITC-conjugated Myc-tag-specific mAb (clone 9E10).	275
13. Untransfected and P2X7-expressing cells generated in Subheading 3.1.	276 277
14. FACS-Buffer: PBS, 0.2% BSA.	278

2.6 Nanobody Reformatting into Diabodies and Heavy Chain Antibodies

1. 10 µM PCR primer solutions: f.VHH-SfiI, r.VHH1-20GS, f.VHH2-15GS, r.VHH-NotI (<i>see</i> Table 1).	279 280
2. Q5 high-fidelity DNA polymerase (2000 U/mL) and 10× Cutsmart buffer.	281 282

3. PCR clean up kit.	283
4. pHEN2 phagemid vector (C-terminal 6×His, Myc tags),	284
5. Agarose gel: 1× TAE buffer, 1.0% (w/v) agarose, 1:10.000 ROTI®GelStain.	285 286
6. Gel extraction kit.	287
7. Restriction enzymes (each 20 U/μL): SfiI, NotI-HF, BamHI.	288
8. pCSE2.5 mammalian expression vector,	289
9. HEK293-6E cells.	290
10. F17 transfection medium: Freestyle F17 expression medium, 4 mM L-glutamine, 0.1% pluronic, sterile filtered.	291 292
11. Feeding medium: F17 transfection medium, 20% tryptone (w/v), sterile filtered.	293 294
12. Optional: Protein A sepharose and Ni-NTA sepharose.	295

**2.7 In Vivo
Production of
Nanobodies and hcAbs**

1. Expression constructs encoding selected nanobodies or hcAbs and plasmid containing the flanking AAV2 ITR sequences and a ubiquitous promoter.	296 297 298
2. Phosphate buffered saline (PBS ^{−/−}), pH 7.4, without Ca ²⁺ and Mg ²⁺ .	299 300
3. Anaesthetics: Imalgene 1000 (100 mg/mL ketamine), 2% Rompun (20 mg/mL xylazine), or ISO-VET (100% isofluorane).	301 302 303
4. Electric clipper.	304
5. Insulin syringe.	305
6. Animal temperature heating pad (e.g., reference 04-777-144 from Fisher Scientific), Electric clippers (e.g., reference NC0854141 from Fisher Scientific).	306 307 308
7. Anticoagulant: 500 USP/mL Heparin sodium diluted in PBS ^{−/−} (working solution) or 2.5 mM EDTA disodium salt diluted in PBS ^{−/−} (working solution).	309 310 311
8. ACK buffer to lyse red blood cells, 150 mM NH ₄ Cl, 10 mM, KH CO ₃ , and 0.1 mM Na ₂ -EDTA dissolved in H ₂ O and adjusted to pH 7.4.	312 313 314
9. 100 mM Adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP) (e.g., A2383 from Merck) dissolved in PBS. Stock solution, store at −80 °C in small aliquots.	315 316 317
10. FACS-Buffer: 0.2% BSA in PBS without Ca ²⁺ and Mg ²⁺ (PBS ^{−/−}).	318 319
11. Ready made solution for cell fixation and red blood cells lysis (e.g., 1-step Fix/Lyse solution from eBioscience, or RBC Lysis/Fixation Solution from Sony Biothechnology).	320 321 322

12. Fc-block (anti-CD16/CD32 antibody, clone 2.4G2) to inhibit binding of antibodies to Fc-receptors.	323
	324
13. Fluorescently labeled antibodies:	325
(a) To detect P2X7-expressing T cell subsets (anti-CD4 clone RM4-5, anti-CD8 clone 53-6.7, anti-CD25 clone PC-61).	326
	327
	328
(b) To evaluate P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L (anti-CD27 clone LG.3A10, anti-CD62L clone MEL-14).	329
	330
	331
(c) To detect hcAbs on the surface of P2X7-expressing cells (anti-IgG1, anti-IgG2a biotinylated secondary cross-adsorbed polyclonal antibodies).	332
	333
	334
14. Flow cytometer.	335

3 Methods

3.1 Expression Vector Cloning and Cell Transfection

1. Clone the full-length open reading frame of mouse or human P2X7 into an eukaryotic cDNA expression vector (<i>see Note 1</i>).	337
	338
2. To monitor transfection, clone a cDNA expression vector for GFP fused to a nuclear localization signal (<i>see Note 2</i>).	339
	340
3. Passage HEK293T and HEK293-6E cells by discarding used culture medium and wash with 5 mL PBS –/– (37 °C) carefully. Gently flush cells off the surface with F17 complete (37 °C) and a serological pipette. Dilute cells to desired concentrations, e.g., 1:10 every 2 days.	341
	342
	343
	344
	345
4. Passage CHO cells by discarding culture medium. Wash cells with 5 mL PBS –/– (37 °C). Add 1 mL of trypsin-EDTA and incubate at 37 °C for less than 5 min in the incubator. Add 4 mL DMEM complete and centrifuge cells at 150 × g, 5 min. Discard supernatant and resuspend cells to desired concentration, e.g., 1:10 every 2 days.	346
	347
	348
	349
	350
	351
5. Transfect cells at 50–70% confluency, the day after passaging.	352
6. Mix expression plasmids (5 µg P2X7, 0.5 µg GFP-NLS) in 150 mM NaCl (final vol. 250 µL), vortex 10 s (<i>see Notes 3 and 4</i>).	353
	354
	355
7. Mix 20 µL PEI reagent with 150 mM NaCl (final vol. 250 µL), vortex 10 s.	356
	357
8. Dropwise add PEI solution to DNA solution (not in reversed order), vortex 15 s.	358
	359
9. Incubate for 15–30 min at RT.	360
10. Distribute PEI-DNA solution dropwise onto HEK293/HEK293-6E or CHO cells and incubate for 24–48 h at 37 °C and 5% CO ₂ (<i>see Note 5</i>).	361
	362
	363

3.2 Immunization of Rodents and Llamas

1. Transform *E. coli* with human or mouse P2X7 and prepare plasmid. 364 365
2. Conjugate the P2X7 cDNA expression vector onto gold particles by diluting 50 µg DNA in 50 µL Tris-EDTA. Add 100 µL spermidine, mix and pipet onto 25 mg gold particles (1 µm diameter), vortex and incubate in an ultrasonic bath for 1 min (*see Note 6*). 366 367 368 369 370
3. Dropwise add 100 µL of CaCl₂ solution while vortexing, incubate for 10 min (start with tubing preparation, **step 5**). 371 372
4. Centrifuge at 16,000 × *g* at 4 °C and discard supernatant. Wash pellet three times with 1 mL absolute ethanol, once with 1 mL PVP-ethanol and resuspend pellet in 3 mL PVP-ethanol. 373 374 375 376
5. Assemble the tubing preparation station and insert Tefzel tubing. Wash the tubing by sucking up 100% ethanol with a 20 mL syringe and dry by applying N₂ gas into the tubing. 377 378 379
6. Vortex the DNA/gold/ethanol solution (**step 3**) and quickly suck the solution into the Tefzel tubing with a 20 mL syringe and let the DNA-gold particles sediment for 3–5 min without gas supply. 380 381 382 383
7. Slowly suck the ethanol from the Tefzel tubing using a syringe without disturbing the sedimented DNA-gold particles. 384 385
8. Slowly rotate the tubing by 180° and let it sit for 5 s. Apply constant rotation to the tubing for 20 to 30 s. Apply N₂-gas at a flowrate of 3 to 4 L/min for 5 min. 386 387 388
9. Retrieve tubing from the tubing prep station and cut with the tubing cutter apparatus into 20 mm long cartridges. Store ammunition under dry conditions at 4 °C (add silica dry packs to the container) until immunization (*see Note 7*). 389 390 391 392
10. Anesthetize mice, rats and rabbits with Isoflurane gas and maintain normothermia using a heating pad. 393 394
11. Prior to immunization, shave the animal skin with fresh clippers. Remove residual hair and hair roots with a mild depilatory cream. Thoroughly remove the cream with warm water and a soft cloth (*see Notes 8 and 9*). 395 396 397 398
12. Load the cartridge holder with 12 cartridges and place into the gene gun. Connect the gene gun to a helium gas flask. Cover the ears of the animal with cotton pads and apply 4–12 shots, 0.2–2 cm apart, onto the shaved skin (*see Notes 10 and 11*). Exemplary photos of immunized animal skin are shown in Fig. 2. Repeat immunizations every 2–3 weeks for 4–6 times, depending on the achieved antibody titer (*see Notes 12 and 13*). 399 400 401 402 403 404 405
13. 10 days after the third boost immunization draw blood (~100–200 µL for mice and rats by puncture of the 406 407

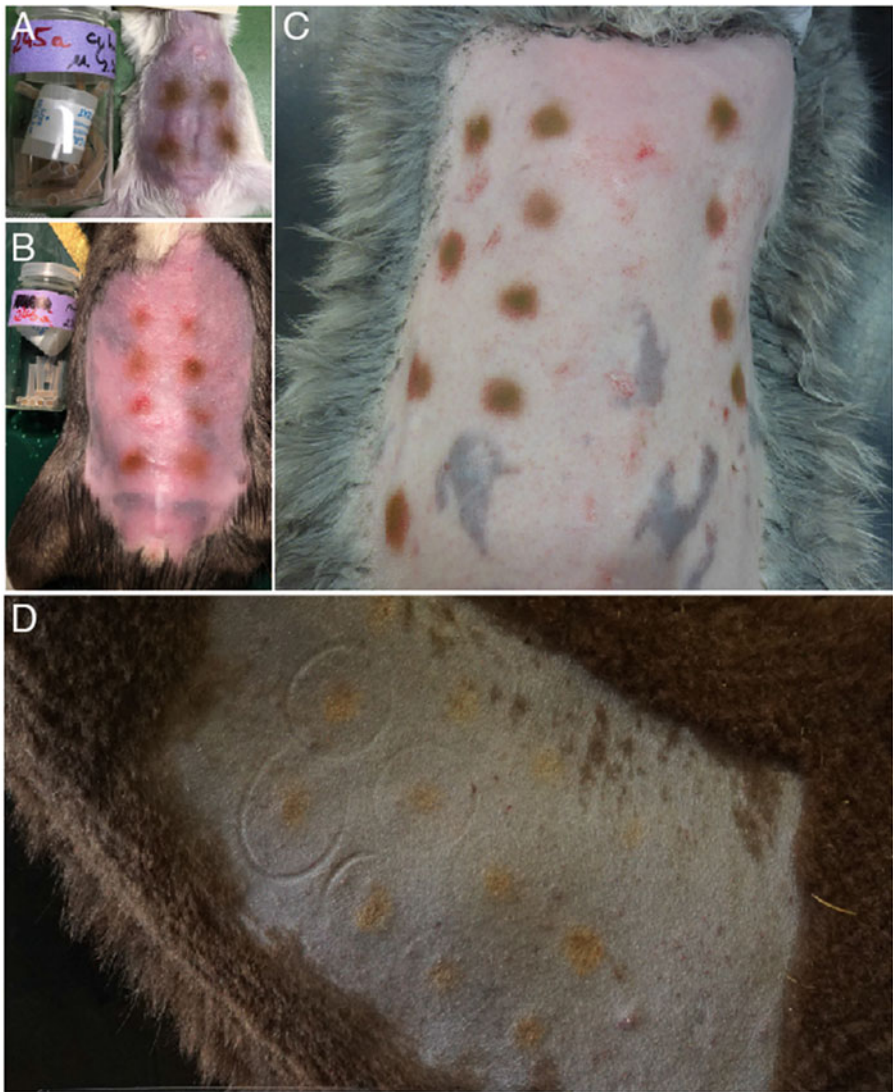


Fig. 2 Photos of animal skin after gene gun immunization. Skin of animals (**a**: mouse, **b**: rat, **c**: rabbit, **d**: alpaca) was shaved with fresh clippers and treated with a depilatory cream to ensure maximum gold particle penetration. Flasks in (**a**) and (**b**) contain plastic tubing cartridges coated on the inner wall with cDNA expression vectors coupled to 1 μ m gold particles. A silica gel pack serves to keep the ammunition dry

- submandibular bundle at the back of the jaw with a lancet, 408
~1–10 mL for rabbits (marginal ear vein) and llamas (jugular 409
vein) with a 19–23 gauge butterfly needle) and test serum for 410
specific antibodies by immunofluorescence microscopy (IFM). 411
14. For IFM, transfect CHO cells as described in Subheading 3.1 412
and seed cells into sterile 96-well flat bottom plates. 413
15. 36 h after transfection, fix cells in PFA for 10 min, wash twice 414
with PBS and incubate with 100 μ L of serial dilutions of serum 415

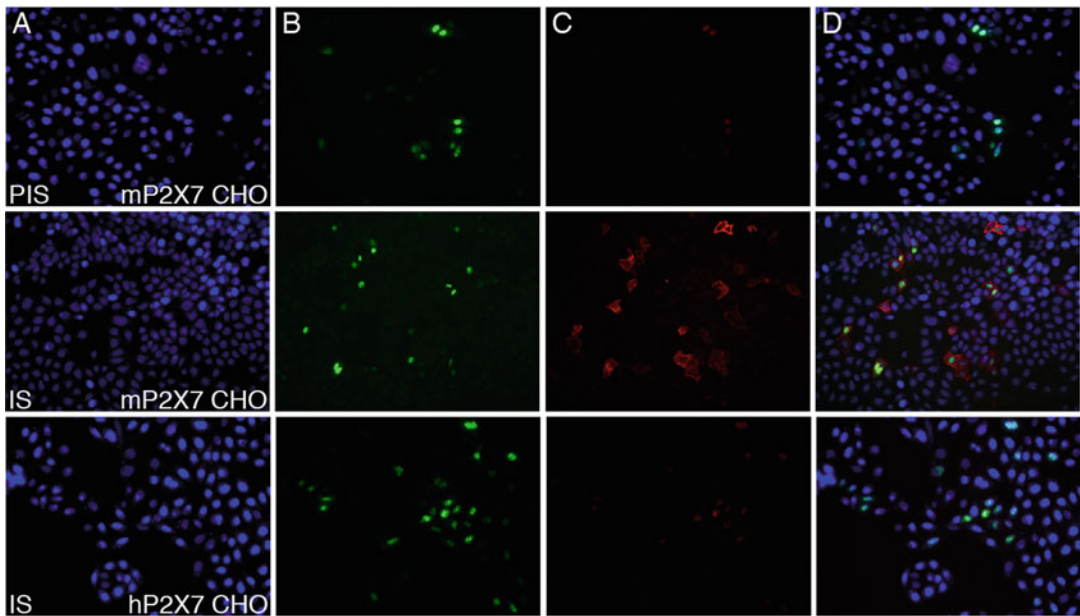


Fig. 3 Immunofluorescence analysis of CHO cells transiently cotransfected with expression vectors for GFP and mouse P2X7. CHO cells were cotransfected with nuclear GFP and mouse P2X7 (top two rows) or human P2X7 as negative control (third row). 24 h after transfection, cells were fixed and incubated with rabbit preimmune serum (PIS) or immune serum (IS), each diluted 1:800 in PBS. Bound antibodies were detected with PE-conjugated rabbit IgG-specific secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Cells were analyzed with an EVOS inverted fluorescence microscope with filters for Hoechst (a), GFP (b) or R-Phycoerythrin (c). (d) overlay of (a–c)

(range: 10^{-2} to 10^{-5}) in DMEM complete for 20 min at RT (see Note 14). Wash cells twice and incubate cells with R-phycoerythrin (R-PE)- or Allophycocyanin (APC)-conjugated rabbit-IgG-specific antibodies for 20 min in the dark. Counter-stain nuclei with Hoechst 33342 (10 μ M) and analyze by IFM (see Note 15, Fig. 3). Antibody titers are determined as the highest dilution factor of the serum resulting in a positive signal, that is, allowing for a discrimination of transfected and untransfected cells based on secondary antibody fluorescence.

3.3 Generation of P2X7-Specific Monoclonal Antibodies

1. After DNA immunizations, inject mice or rats (from Subheading 3.2.) with a final boost of 2×10^6 P2X7-expressing cells (from Subheading 3.1) in 200 μ L PBS by i.v., i.p. or s.c. injection and/or with immunoprecipitated P2X7 on antibody-conjugated agarose-beads (see Subheading 3.4, step 2) resuspended in 200 μ L PBS s.c. and/or i.p.
2. Sacrifice animals 3 days after the final boost by isoflurane anaesthesia and terminal bleeding by cardiac puncture using a 22G cannula and 2 mL syringe.

3. Isolate lymph nodes and spleen under aseptic conditions using sterile dissection instruments. 435
436
4. Prepare lymphocyte suspensions by gently mincing spleen and lymphnodes with scissors and squeezing the cells gently with a plunger through a 70 μ m-cell strainer. Wash cells with sterile 15 mL PBS and pass through an additional 70 μ m cell strainer twice with 5 mL RPMI complete with gentamycin. 437
438
439
440
441
5. Harvest T225 HAT-sensitive SP2/0 myeloma cells (grown in RPMI complete to 70–90% confluency) and wash three times with 10 mL RPMI complete medium. 442
443
444
6. Mix 1×10^7 lymphocytes and 3×10^7 SP2/0 cells in a 50 mL tube and centrifuge at $450 \times g$ for 8 min at RT. Discard supernatant completely. 445
446
447
7. Break the cell pellet by tapping, place the tube in a beaker containing water at 38 °C and add 1 mL PEG dropwise for 1 min under gentle stirring. Gently rotate the tube for 90 s. 448
449
450
8. Slowly (over 7 min) add 10 mL RPMI+gentamycin (preheated to 37 °C) and centrifuge for 10 min at $210 \times g$ at 24 °C. 451
452
9. Resuspend pellet in 5 mL freezing medium and freeze four aliquots for storage in liquid N₂. Use the remaining 1 mL of cell suspension directly for plating. 453
454
455
10. Dilute 0.5 mL of the fused cells with 80 mL HAT-Medium and plate onto four 96-well plates (200 μ L/well). Dilute the other 0.5 mL with 160 mL HAT-Medium and plate onto eight 96-well plates (*see Note 16*). 456
457
458
459
11. After 10 days of incubation at 37 °C, screen clone supernatants for antigen-specific antibodies by IFM (*see Subheading 3.2, steps 14 and 15*) or FACS of P2X7/GFP cotransfected CHO cells or HEK293 cells (*see Fig. 4*). 460
461
462
463
12. Subclone positive clones by limiting dilution (*see Note 17*) [15]. 464
465

3.4 Generation of P2X7-Specific Nanobodies

1. Draw 1–10 mL blood of the immunized llama 10 days after the third boost immunization and test serum for specific antibodies by IFM or flow cytometry (*see Subheading 3.2, steps 14 and 15, Fig. 5*). Titers vary with immunogen and animal (1:50–1:50,000). Titers for DNA-immunized animals are often lower than for animals immunized with protein and adjuvant. 466
467
468
469
470
471
2. Covalently link P2X7-specific mAb Hano 44 [16] to aldehyde-activated agarose beads according to the manufacturer's instructions (e.g., AminoLink). 472
473
474
3. Harvest 1×10^8 HEK cells stably transfected with P2X7 and wash twice with PBS. Resuspend pellet in 10 mL lysing solution and incubate on ice for 20 min. Pellet cell debris at $800 \times g$ 475
476
477

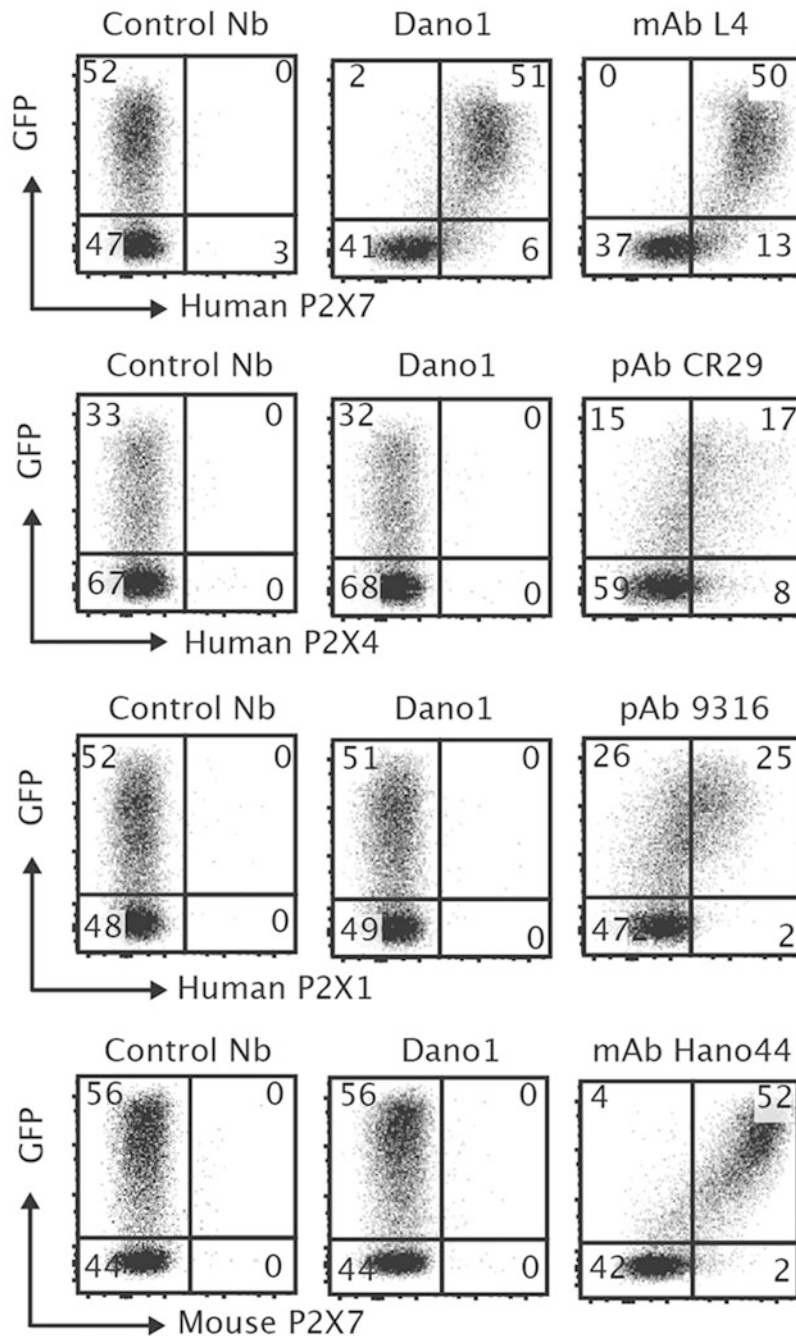


Fig. 4 FACS analysis of HEK cells transiently cotransfected with expression vectors for GFP and the indicated P2X family members. HEK293-T cells were transiently cotransfected with GFP and human P2X7, human P2X4, human P2X1 or mouse P2X7. 48 h after transfection, cells were stained with the indicated primary antibodies. The negative control Nb (binding an irrelevant protein, e.g., *C. difficile* ToxA) and the P2X7-specific Nb Dano1 were used in a mouse IgG1 hAb format. mAb and pAb indicate monoclonal or polyclonal antibodies that were used as positive controls. Bound antibodies were detected with appropriate Alexa Fluor 647-conjugated secondary IgG-specific antibodies. Dano1 hAb and mAb L4 specifically recognize human P2X7, mAb Hano44 specifically recognizes mouse P2X7. (Reproduced with permission of The American Association for the Advancement of Science ©2016 (Danquah et al., Sci. Transl. Med. 8, 366ra162, Fig. 6A))

- for 10 min at 4 °C. Immunoprecipitate native P2X7 from the supernatant by adding 100 µL Hano44-conjugated beads and gentle aggitation over night at 4 °C on a roller. Pellet beads by centrifugation at $200 \times g$ for 5 min, discard supernatant, and wash beads twice with 5 mL lysis solution, each time aggitating for 5 min on a roller and pelleting of beads by centrifugation at $200 \times g$ for 5 min. Resuspend beads in 500 µL lysis buffer. Estimate yield and purity by analyzing 10 µL of the precipitate by SDS-PAGE and Coomassie staining (expect to recover ~5 µg P2X7/100 µL beads from 2×10^8 cells). Inject llamas with beads suspended in lysis buffer subcutaneously.
4. After four DNA immunizations, give the animals a final boost of 2×10^7 P2X7-expressing cells in 500 µL PBS by s.c. injection and/or with immunoprecipitated P2X7 on antibody-conjugated agarose-beads s.c. (Fig. 5).
 5. Draw 100 mL anticoagulated blood from the jugular vein 4 days after the last protein boost or 7 days after the last cDNA boost (*see Note 18*).
 6. Isolate PBMCs by Ficoll-Paque gradient centrifugation [17].
 7. Prepare total RNA from 10^7 PBLs using an RNA mini preparation kit (*see Note 19*).
 8. Reverse transcribe into cDNA using 1.5 µg RNA, 50 µM random hexamers, 10 mM dNTPs, 1 µL RNaseOut and 1 µL Superscript III reverse transcriptase.
 9. Amplify the VHH coding regions from total cDNA by using 10 µL cDNA, 1 µL primers f.VHH and r.CH2 (10 µM each), 1 µL dNTPs, 5 µL 10× Buffer, 1 µL Q5 Polymerase.
 10. Separate PCR reaction products by 1% agarose gelelectrophoresis and cut out the VHH band (ca. 800 bp). Purify the DNA from the gel piece with a cleanup kit. Reamplify the VHH coding region with the same reaction conditions as in **step 7** but with 1 µL of each primer f.VHH-SfiI and r.VHH-NotI to introduce 5' and 3' restriction sites.
 11. Double-digest VHH-encoding DNA fragments and the pHEN2 phagemid vector with SfiI and NotI (*see Notes 20 and 21*).
 12. Ligate VHH-encoding DNA fragments and the pHEN2 phagemid vector at an insert to vector ratio of 3:1 and electroporate purified ligation products into 25 µL electrocompetent TG1 *E. coli* cells (*see Note 22*).
 13. Take up cells in 975 µL recovery medium, incubate for 1 h to express ampicillin resistance, and streak 200 µL onto five large LB-carb-glu plates. To determine library size, streak serial dilutions of transformed cells onto small LB-carb-glu plates.

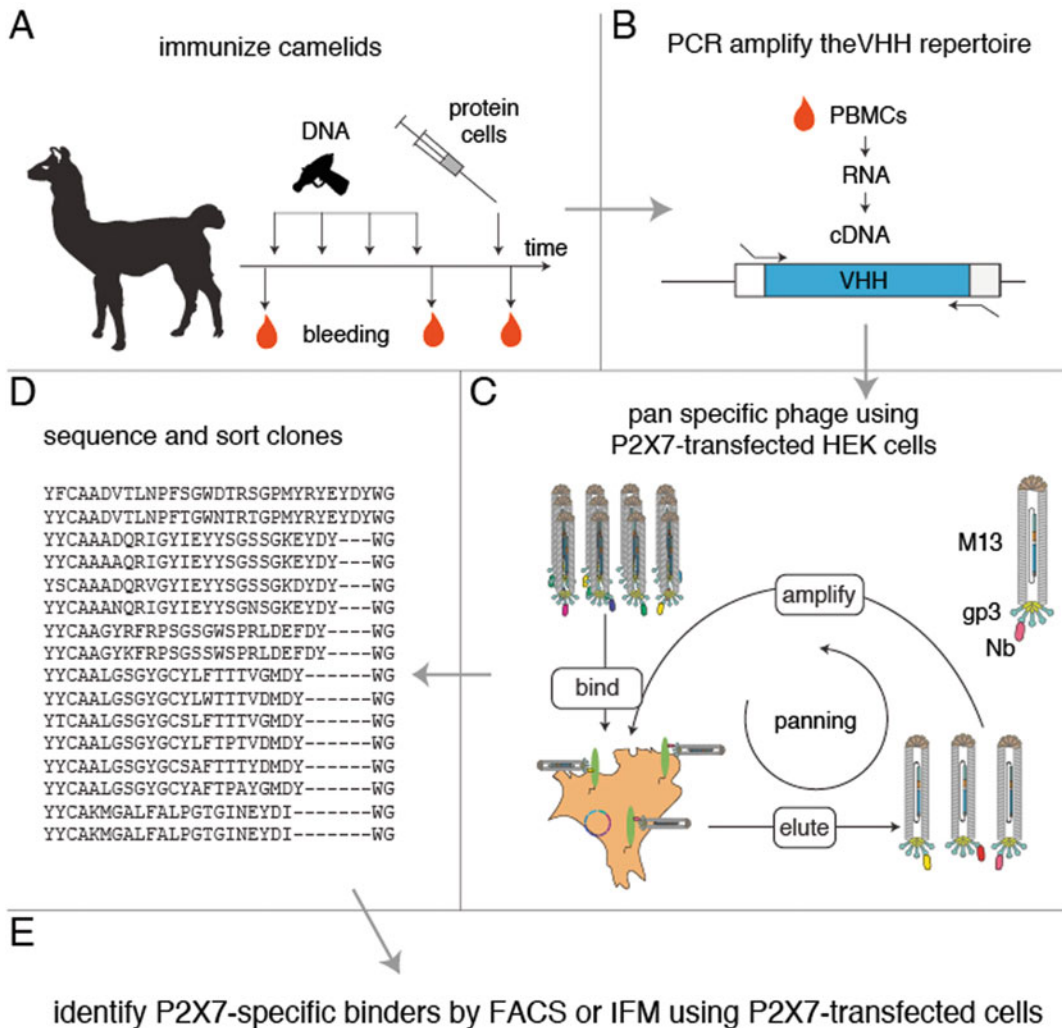


Fig. 5 Schematic representation of nanobody discovery from DNA-immunized llamas by phage display technology. **(a)** Llamas are immunized four times by ballistic DNA immunization, each with 12 shots of 1 μ g P2X7-encoding cDNA vectors conjugated to 1 μ m gold particles. A final boost is applied with 2×10^7 transfected HEK cells. **(b)** Lymphocytes are isolated from blood, total RNA is extracted and transcribed into cDNA. The VHH repertoire is amplified by PCR using primers to add restriction sites suited for cloning into a M13 phagemid vector, placing the VHH downstream of a bacterial signal peptide and upstream of a Myc tag, amber stop codon and the gp3 capsid protein. **(c)** Phages displaying a P2X7-specific VHH are enriched by panning on P2X7-transfected HEK cells. **(d)** Selected clones are sequenced and clone families are analyzed for diversity and abundance. **(e)** Individual clones are expressed as Myc-tagged nanobodies in the periplasma of HB2151 *E. coli*. Nanobodies are screened for specific binding to P2X7-transfected CHO cells or HEK293 cells by IFM or FACS using a fluorochrom-conjugated Myc specific mAb (clone 9E10). (Reproduced under the CC BY license (Eden et al. Frontiers in Immunology Vol. 8 January 2018, Fig. 7))

14. After over night incubation, scrape TG1 from the large plates in 5 mL 2×YT-medium per plate, pellet TG1 by centrifugation at 3500 × *g* and resuspend in 1.5 mL freezing medium. Store glycerol stocks at −80 °C. 522–525
15. Scrape an aliquot of cells from the frozen glycerol stock with a sterile pipette tip and grow TG1 containing the phagemid library until OD₆₀₀ = 0.3 in 2×YT-carb-glu medium. Super-infect TG1 cells by incubation with M13KO7 helper phage at MOI (multiplicity of infection) of 10 for 30 min at 37 °C and 150 rpm (Example: 5 mL of a culture with an OD₆₀₀ of 0.3 correspond to 1.2 × 10⁹ bacteria, so add 1.2 × 10¹⁰ helperphages). 526–533
16. Pellet bacteria by centrifugation at 560 × *g* and resuspend in 50 mL 2×YT-kana-carb medium. Produce phages at 25 °C and 250 rpm over night. 534–536
17. Pellet the bacteria by centrifugation and harvest phage from the supernatant by precipitation with polyethylene glycol (mix 40 mL supernatant with 10 mL PEG/NaCl (5×) and incubate on ice for at least 1 h). 537–540
18. To remove cellular debris, wash phage pellets by repetitive resuspension in 1 mL PBS and centrifuge at 16,000 × *g* for 10 min at RT. 541–543
19. Estimate library size by infecting TG1 cells with a serial dilution of phages (10^{−4} to 10^{−13}) and count colonies on 2×YT-kana plates. 544–546
20. For negative selection on untransfected HEK cells, resuspend 10¹¹ phages in 1 mL blocking buffer for 30 min before mixing with 2.5 × 10⁷ untransfected HEK cells in DMEM complete. Incubate cells and phages for 1–2 h at 4 °C. 547–550
21. Pellet cells by centrifugation at 560 × *g* for 5 min, transfer phage-containing supernatant to 2.5 × 10⁷ P2X7-transfected HEK293T cells for positive selection (*see* **Notes 23** and **24**). Incubate cells and phages for 1–2 h at 4 °C. 551–554
22. Pellet cells by centrifugation at 560 × *g* for 5 min and wash cells 10–15 times with 10 mL blocking buffer and a final wash with PBS to remove unbound phages and blocking agents (*see* **Note 25**). 555–558
23. Elute phages from the cell pellet by resuspension in 250 µL trypsin solution for 15 min at RT. Pellet cells by centrifugation at 560 × *g* for 5 min. Harvest the supernatant and inactivate trypsin by adding 25 µL of AEBSF solution (4 mg/mL). 559–562
24. Infect 2.5 mL exponentially growing TG1 (OD₆₀₀ = 0.5) with 125 µL eluted phages by incubation under shaking at 150 rpm at 37 °C for 30 min. 563–565

25. Pellet infected TG1 cells by centrifugation at $3500 \times g$ for 10 min at 4 °C and resuspend cells in 300 μ L 2 $\times$ YT medium. Plate cells on LB-carb-glu plates. Incubate at 30 °C overnight (*see Note 26*). 566
567
568
569
26. Scrape and resuspend colonies in 10 mL 2 $\times$ YT-medium, pellet at $4600 \times g$ for 10 min. Resuspend in 3 mL 2 $\times$ YT freezing medium and store at -80 °C. 570
571
572
27. Use these TG1 cells for further rounds of panning following steps 12–20. 573
574

3.5 P2X7-Specific Nanobody Production and Verification

1. Plate TG1 cells from a glycerol stock containing phagemids after phage panning on a 2 $\times$ YT-carb-glu plate. 575
576
2. Pick 96 individual clones, grow in 2 $\times$ YT-carb-glu medium, prepare plasmid DNA, and sequence with primer LMB3 (Table 1). Analyze translated DNA sequences for diversity and abundance of selected clone families. 577
578
579
580
3. Transform HB2151 *E. coli* cells with plasmids representing the most abundant clone from a family and grow in 50 mL 2 $\times$ YT-carb medium (*see Note 27*). 581
582
583
4. Induce expression of nanobodies when cultures reach an OD₆₀₀ of ~ 0.5 by adding 0.5 mM IPTG. Incubate further for 5 h at 37 °C. 584
585
586
5. Harvest HB2151 cells by centrifugation at $4600 \times g$ for 15 min. 587
588
6. Prepare periplasmic lysates by resuspending cells in 5 mL PP lysis buffer per g of cells and incubate for 20 min on ice. 589
590
7. Pellet spheroblasts by centrifugation at $22,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. Harvest supernatant (periplasma lysates) and pass through a 0.45 μ M filter. 591
592
593
8. Analyze proteins in periplasma lysates by SDS-PAGE and Coomassie staining. Estimate the concentration of the nanobodies by comparing the staining intensity to marker proteins of known quantities (a useful range is 50 ng–2 μ g/protein band). 594
595
596
597
9. Optional: to prepare a bivalent detection reagent, incubate an aliquot of periplasma lysate containing 100 ng of nanobody with 500 ng of FITC-conjugated Myc-specific mAb (clone 9E10) for 10 min at RT in the dark (*see Note 28*). 598
599
600
601
10. Incubate untransfected and P2X7-transfected HEK cells with the preformed nanobody anti-Myc complexes for 20 min in the dark at 4 °C. 602
603
604
11. Wash cells twice with 5 mL FACS buffer by centrifugation at $560 \times g$ for 5 min at 4 °C. 605
606
12. Resuspend cells in FACS buffer and detect bound antibodies by flow cytometry. 607
608

3.6 Nanobody Reformatting into Diabodies and Heavy Chain Antibodies

1. To reformat nanobodies as homomeric or heteromeric dimers (diabodies), amplify the first nanobody with primers f.VHH-SfiI (to add a 5' SfiI restriction site) and r.VHH1-20GS (to add a 3' 20 amino acid GS linker and a BamHI site) (*see* Table 1 and Note 29). Purify amplification product with a PCR clean up kit. Digest 500 ng PCR product with 1 μ L SfiI in 1 $\times$ Cutsmart buffer at 50 °C for 12 h and subsequently with 1 μ L BamHI for further 3 h. 609 610 611 612 613 614 615 616
2. Amplify the second VHH with primers f.VHH2-15GS and r.VHH-NotI (to introduce a 5' BamHI site and a 15 amino acid GS linker, and a 3' NotI restriction site (*see* Table 1)). Purify amplification product with a PCR clean up kit. Digest 500 ng PCR product with 1 μ L BamHI, 1 μ L NotI in 1 $\times$ Cutsmart buffer for 3 h. 617 618 619 620 621 622
3. In parallel, digest 2 μ g pHEN2 with 1 μ L SfiI, 1 μ L BamHI in 1 $\times$ Cutsmart buffer for 3 h and purify by gel electrophoresis. 623 624
4. Purify digested Inserts and pHEN2 vector from steps 1 and 2 with a PCR clean up kit. 625 626
5. Clone both nanobody fragments into pHEN2 resulting in *SfiI*-Nb1-35GS-*BamHI*-15GS-Nb2-*NotI*-6xHis-Myc and produce the recombinant dimer as described in Subheading 3.5. 627 628 629
6. To reformat nanobodies into hcAbs for expression in eukaryotic cells, clone the nanobody coding sequence flanked by 5' Nco I and 3' Not I sites into the pCSE2.5 expression vector [18]. This vector contains the coding sequences for the IgH signal peptide and intron upstream of the NcoI site and the open reading frame for the hinge, CH2, and CH3 domains of human IgG1 or rabbit IgG downstream of the NotI site. 630 631 632 633 634 635 636
7. Nanobodies in the pCSE2.5 expression vector are produced by transfection of HEK293-6E cells. One hour before transfection exchange medium against F17 transfection medium and transfect cells as described in Subheading 3.1. 637 638 639 640
8. One day post transfection feed cells with F17 feeding medium (*see* Note 30). 641 642
9. 6 days post transfection harvest supernatants by sequential centrifugation at $560 \times g$ for 5 min for 5 min to remove cells and at $4600 \times g$ for 20 min to remove cell debris. 643 644 645
10. Verify the purity and integrity of nanobodies and hcAbs by SDS-PAGE and Coomassie staining (*see* Subheading 3.5, step, Fig. 6). 646 647 648
11. Optional: Purify hcAbs by affinity chromatography with Protein A immobilized on Sepharose beads. Purify nanobody monomers and dimers carrying a Hexahistidin-tag by 649 650 651

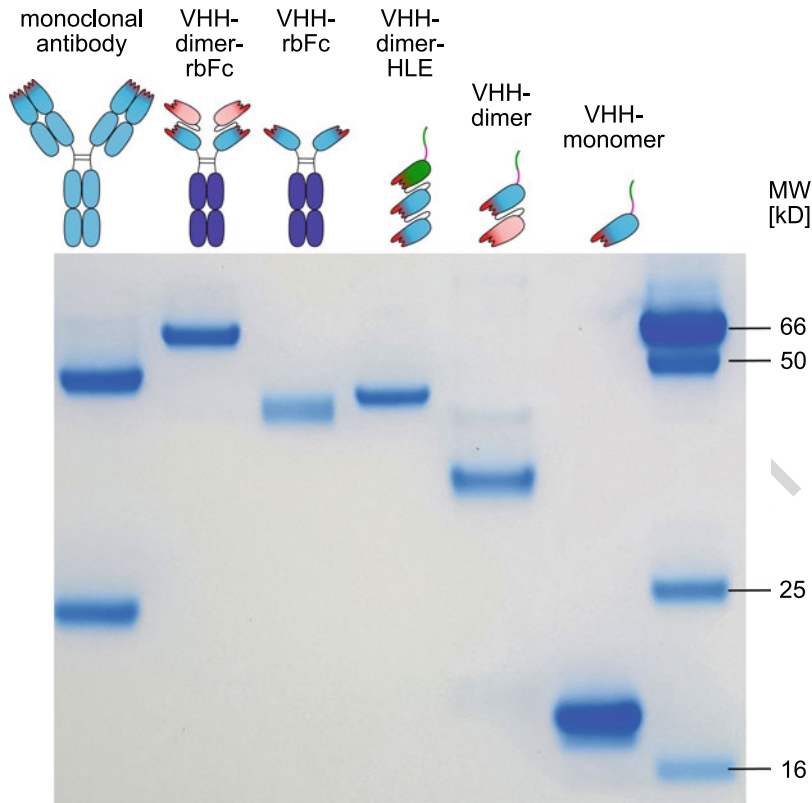


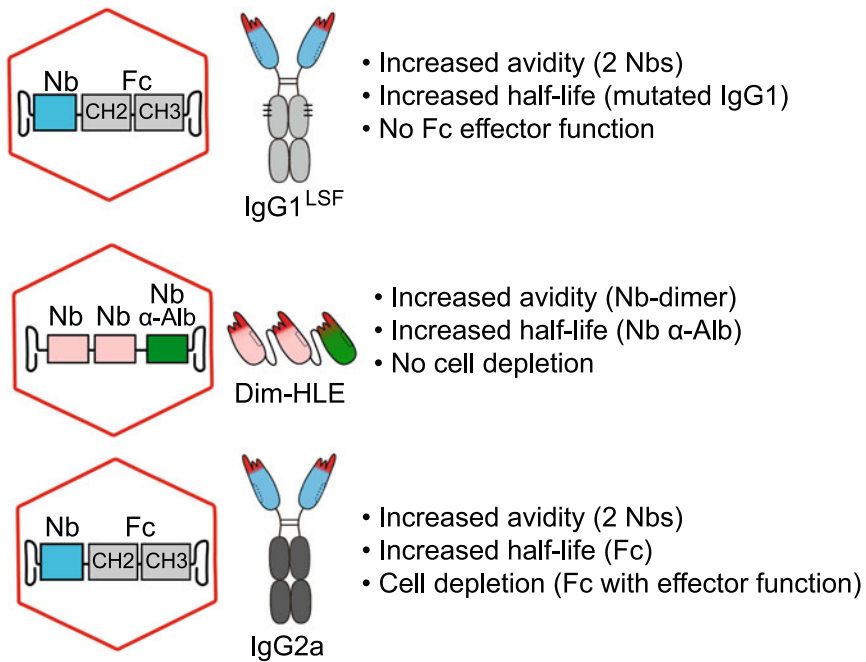
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified P2X7-specific antibodies and nanobodies. Proteins are indicated schematically on top of each lane. Antibodies were purified by affinity chromatography on protein G sepharose, nanobodies on Ni-NTA agarose. Purified proteins were size fractionated by SDS-PAGE under reducing conditions and visualized by Coomassie staining. The marker proteins contain known amounts of lysozyme (16 kD, 100 ng), IgL (25 kD, 250 ng), IgH (50 kD, 500 ng), and BSA (66 kD, 1 μ g). In the schematic diagrams, Ig-domains are indicated by egg-shaped ovals, CDR loops are indicated in red, inter-chain disulfide bridges by black lines, C-terminal hexahistidin and Myc tags by pink and green lines, respectively. The CH2 and CH3 domains of rabbit IgG are indicated in dark purple (rb hcAb), the albumin-specific nanobody in the half-life extended (HLE) dimer is indicated in green. Pink and blue nanobodies indicate heteromeric binding moieties

immobilized metal affinity chromatography (IMAC), e.g., 652
using Ni-NTA immobilized on agarose beads. Exchange the 653
buffer by size exclusion chromatography and store antibodies 654
at -80°C . 655

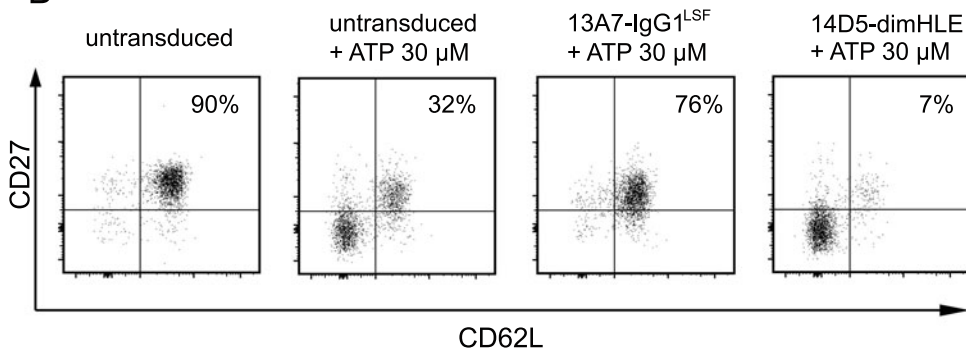
3.7 In Vivo 656 Production of 657 Nanobodies and hcAbs 658 Using rAAV Vectors 659

1. Clone expression constructs coding for selected nanobodies or 656
hcAbs into a plasmid containing the flanking AAV2 ITR 657
sequences and a ubiquitous promoter (e.g., CAG or EF-1 α 658
promoter) [19]. 659
2. Produce rAAV1 or rAAV8 vector encoding nanobodies or 660
hcAbs (Fig. 7a) using standard helper-virus free transient triple 661
transfection [19] (see Note 31). 662

A



B



C

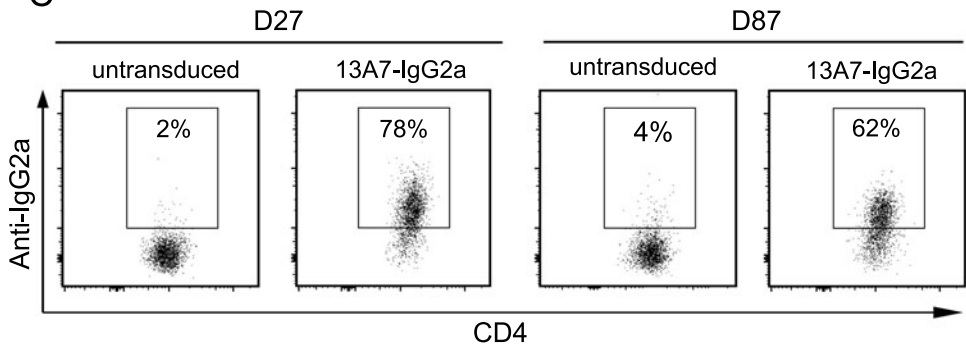


Fig. 7 rAAV-mediated production of P2X7-specific nanobodies and hcAbs in vivo. (a) Schematic representation of AAV vectors encoding various formats of P2X7-specific nanobodies and hcAbs: fused to (1) the LSF mutant

3. Store purified and titrated rAAV stock solutions at -80°C in small aliquots at a concentration of $>10^{12}$ vg/mL. Before injection, thaw rAAV vectors on ice and dilute to a concentration of 10^{12} vg/mL in PBS. Inject each mouse with a maximum volume of 100 μL corresponding to a total dose of 10^{11} vg/animal. 663–668
4. Anaesthetize mice with an intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (3 mg/kg) or by isoflurane gas anesthesia. 669–671
5. Shave the hind legs of mice with an electric clipper. 672
6. Inject 25 μL of rAAV1 or rAAV8 intramuscularly with 29G insulin syringe each into 1–4 sites of 4 different muscles (e.g., gastrocnemius and quadriceps muscles). Using rAAV8, 10^{11} vg in 100 μL of PBS can be injected intravenously to preferentially transduce the liver. 673–677
7. Maintain normothermia using a heating pad and monitor awakening of the mice before returning to their cage. 678–679
8. To verify blockade and/or potentiation of P2X7-specific nanobodies produced in vivo collect 100 μL of blood in 500 μL PBS –/– containing 500 USP heparin or 2.5 mM EDTA to prevent coagulation, wash and prepare the tube as described below (steps 9–16) to monitor ATP-induced shedding of CD27 and/or CD62L by T cells ex vivo [4]. 680–685
9. Centrifuge the blood cells at $150 \times g$, 8 min, at 4°C and remove plasma. 686–687
10. Add 1 mL of ACK buffer (red blood cells lysis), incubate 5 min at RT (*see* Note 32). 688–689
11. Wash the cells with 4 mL FACS buffer, centrifuge at $300 \times g$ for 5 min at 4°C and discard the supernatant. 690–691

Fig. 7 (continued) [21] (T252L, T254S, T256F) of mouse IgG1 with increased serum half life and low Fc-mediated effector functions, (2) an albumin-specific nanobody conferring half-life extension (HLE), or (3) IgG2a conferring Fc-mediated effector functions (e.g., cell depletion via antibody dependent cellular cytotoxicity and complement dependent cytotoxicity). (b) Evaluation of the functional activity of P2X7-specific nanobodies and hcAbs on CD4^{+} T cells of B6 mice, 21 days after i.m. injection of rAAV1 vectors encoding the P2X7 antagonistic 13A7-IgG1^{LSF} or the P2X7- potentiating 14D5-dim-HLE [4]. Blood cells were incubated with or without ATP for 20 min at 37°C and analyzed by flow cytometry for P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L. Gating was performed on CD4^{+} T cells. Numbers indicate the percentage of $\text{CD62L}^{+}\text{CD27}^{+}$ cells among the gated cells. (c) Detection of 13A7-IgG2a hcAbs bound to P2X7-expressing $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ Tregs of BALB/c mice, 27 days and 87 days after i.m. injection of rAAV8 vectors encoding 13A7-IgG2a. Blood cells were analyzed for hcAbs bound to the surface by flow cytometry using an IgG2a-specific antibody. Gating was performed on $\text{CD4}^{+}\text{CD25}^{+}$ Tregs. Numbers indicate the percentages of cells stained by the IgG2a-specific antibody. Treg numbers were estimated to be reduced by 10% and 11% on d27 and d87, respectively (data not shown)

12. Resuspend the cells in 150 μ L of cold PBS –/– and dispatch
on ice 50 μ L of blood cells in three FACS tubes, one that will
serve as a negative control, one will be treated with 30 μ M ATP,
and one with 150 μ M ATP. 692 693 694 695
13. Prepare ATP solutions in PBS –/– at concentrations of 60 μ M
and 300 μ M. Add 50 μ L of these solutions to 50 μ L blood cells.
Mix briefly and incubate cells for 15 min in a 37 °C water bath. 696 697 698
14. Place the tubes on ice, add 4 mL ice-cold FACS buffer, and
pellet cells by centrifugation at $150 \times g$, 8 min at 4 °C. Discard
the supernatant. 699 700 701
15. Resuspend the cells in 50 μ L FACS buffer containing 0.1 μ g
Fc-block (anti-CD16/CD32) and incubate 15 min at 4 °C.
Add 50 μ L FACS buffer containing fluorescently labeled mAbs
against CD4, CD8, CD25, CD62L and CD27 and incubate
20 min at 4 °C in the dark. 702 703 704 705 706
16. Wash cells twice with 4 ml FACS Buffer, centrifuge at $150 \times g$,
8 min at 4 °C and discard supernatant. Add 600 μ L FACS
buffer and analyze the level of CD27 and CD62L on the
surface of CD8⁺ cells, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, and
CD4⁺ helper T cells (Fig. 7c). 707 708 709 710 711
17. HcAbs generated in vivo can be detected on the cell surface of
T cells using isotype-specific secondary antibodies. Collect
50 μ L blood samples, and lyse red blood cells using ACK buffer
as described in **steps 11** and **12** above (*see Note 32*). 712 713 714 715
18. Resuspend the cells in 50 μ L FACS buffer containing 0.1 μ g
Fc-block (anti-CD16/CD32) and incubate 15 min at 4 °C.
Add 50 μ L FACS buffer containing fluorescently labeled mAbs
against CD4, CD8, and CD25 as well as a biotinylated IgG2a-
specific mAb and incubate 20 min at 4 °C in the dark. 716 717 718 719 720
19. Wash the cells with 4 mL FACS buffer and centrifuge at
 $150 \times g$ for 8 min at 4 °C. Add 100 μ L FACS buffer containg
0.05 μ g PE-conjugated streptavidin and incubate for 20 min at
4 °C in the dark. 721 722 723 724
20. Wash cells twice with 4 mL FACS buffer at 4 °C and discard
supernatant. Add 600 μ L FACS buffer and analyze the level of
P2X7-specific hcAb on the cell surface by flow cytometry
(Fig. 7c). 725 726 727 728

4 Notes

729

1. To obtain a full-length mouse P2X7 expression vector, amplify
the cDNA from mouse splenocytes or order a codon optimized
ORF as a Geneblock (e.g., Twist Bioscience) and clone it into
an mammalian expression vector, such as pCDNA6.1 (Invitro-
gen) under the control of the CMV promotor. 730 731 732 733 734

2. To obtain a control plasmid for transfection, clone the aminoacids 400–483 of LKLF (Lung Krüppel-like factor, KLF2) transcription factor into pEGFP-N1 vector to express nuclear eGFP [16].
3. To generate a stable transfected cell line, linearize the plasmid before transfection, e.g., by digestion with Ssp1 or another restriction enzyme that cleaves the vector in the ampicillin resistance cassette to achieve a higher genome insertion rate. Add an appropriate antibiotic and monitor levels of P2X7 by flow cytometry.
4. Split cells 1 day before transfection to achieve a confluency of 60–80% on the day of transfection. The protocol can be adjusted to any culture volume by scaling cell numbers, DNA, and PEI concentrations. Here an exemplary transfection for a T25 flask containing $\sim 2 \times 10^6$ cells is described.
5. Monitor transfection efficiency by observing nuclear GFP signal with a fluorescence microscope.
6. A molecular adjuvant may be used by coprecipitating a cDNA expression vector for a potent proinflammatory cytokine (e.g., GM-CSF) or the ligand for a Toll like receptor (e.g., flagellin).
7. Discard cartridges which do not contain precipitated gold (beginning and ending of the tubing).
8. A warm surface is used for rats and mice to maintain body temperature. Rats and mice are anaesthetised using Isoflurane chambers and respiratory masks. Llamas and alpacas are fixed appropriately with a harness and rope. Appropriate training is required and permits need to be obtained for all procedures involving animals.
9. Proper removal of hair and depilatory cream is essential for efficient delivery of gold particles. Residual hair and cream can prevent particles from penetrating the skin.
10. Mice and rats are immunized at 4–6 sites on the abdominal skin at 250–300 psi, rabbits at 12 sites on the back at 400 psi, alpacas and llamas at 12 sites on the lower neck at a pressure setting of 400–600 psi.
11. Quality of gold particle delivery can be estimated by noting the coloration of the skin (*see* Fig. 2) and a wipe test with a soft cloth to ensure that the particles cannot be wiped away.
12. Live, fixed and necrotic cells can be used for immunizations as well. If cells are used for repeated injections, antibody responses against endogenous HEK or CHO cell proteins will be induced.
13. Protein and cell injections can also be performed intraperitoneally or intravenously for rats and mice.

14. Draw blood and prepare serum before the first immunization to be used as control (preimmune serum). Draw blood 10–14 days after the third or subsequent boosts as immune sera. 779 780 781 782
15. As secondary antibody use a fluorochrome that can be distinguished clearly from GFP. Use appropriate secondary antibodies, for example, mouse-IgG specific antibodies for sera from immunized mice. Expect 10–30% transfection efficiency for CHO cells and >50% for HEK cells. The vast majority of transfected cells are cotransfected with both plasmids. Red membrane staining of cells with a green nucleus indicates specific staining. 783 784 785 786 787 788 789 790
16. Only fused hybridoma cells can survive in HAT (Hypoxanthin Aminophtherin Thymidin) containing medium. SP2/0 myeloma cells cannot metabolize HAT and unfused lymphocytes eventually die by limited replication cycles. 791 792 793 794
17. The isotype of the antibodies can be determined by using a mouse or rat immunoglobulin isotyping kit (BD Bioscience). To obtain the sequence of recombinant antibodies, hybridoma cells can be sequenced by a provider of choice (e.g., BIOZOL). 795 796 797 798
18. The peak migration of expanded B cells from the lymph node to the bone marrow is expected 6–7 days after the final boost. 799 800
19. Assess RNA quality by inspection of 28S and 18S RNA bands on 1% agarose gel. The 28S Band (~4700 nt) should be twice as strong compared to the 18S band (~1900 nt). 801 802 803
20. Restriction enzymes SfiI and NotI have different incubation temperatures, first use SfiI at 50 °C for 16 h, then NotI at 37 °C for 3 h. 804 805 806
21. NotI recognizes a restriction site (GCGGCCGC) which is suitable between fusion proteins as it encodes for a triplet of inert amino acids AAA when in the correct reading frame with the nanobody. 807 808 809 810
22. Purify ligation mix and elute in H₂O to reduce amounts of ions which will reduce electroporation efficiency. 811 812
23. When an antibody epitope is well characterized, the corresponding antibody can be used prior phage incubation to block known epitopes of mP2X7 on the transfected cells. By doing so phages are preferentially selected on the unblocked epitopes. 813 814 815 816 817
24. Cells endogenously expressing the antigen can be used for panning as well. 818 819
25. Washing conditions can be adjusted in stringency (e.g., detergent and pH) to select for VHHs with different binding properties. 820 821 822

26. Use multiple plates for streaking to reduce bias in the composition of VHHs in the library caused by differential growth of TG1 cells. 823
27. E. coli strain HB2151 detects the amber stop codon between the Myc tag and the gp3 protein, allowing the production of monomeric Nanobodies with 6×His and Myc tags. 826
28. By prior incubation of the Myc-tagged nanobody monomers with the 9E10 Myc-specific antibody, a 2:1 bivalent complex with a higher avidity is achieved. If only strong binders are preferred, transfected HEK cells are directly incubated with periplasmic lysates and then detected with anti myc in a subsequent step. 829
29. Alternatively, order gene blocks encoding the two nanobodies flanked by linkers and restriction sites. Nb 13A7 effectively blocks, Nb 14D5 potentiates ATP-induced gating of P2X7 [4]. The amino acid sequences of these Nbs are published in patent WO2010/070145. 835
30. Supplementation with additional amino acids can increase production yield [20]. 840
31. Purified and titrated rAAV vector can also be purchased from research service providers as custom-made rAAV by providing the transgene sequence. 842
32. Lysis of red blood cells can be performed after antibody staining using ready made cell fixation and a commercial RBC lysis buffer. 845

Acknowledgments

Supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to F.H. and F.K.-N (No310/13-1, SFB1328A10 and SFB1328Z02), and from the Agence Nationale de la Recherche to S.A. (ANR-18-CE92-0046). We thank Fabienne Seyfried, Gudrun Dubberke, Anna Josephine Gebhardt, and Dorte Wendt (Institute of Immunology, UKE, Hamburg) and Sarah Hewald, Nicole Lüder and Andrea Nitsche, (UKE central animal facility), for excellent technical help with antibody cloning and immunizations.

References

1. Roncador G, Engel P, Maestre L, Anderson AP, Cordell JL, Cragg MS, Serbec VC, Jones M, Lisnic VJ, Kremer L, Li D, Koch-Nolte F, Pascual N, Rodriguez-Barbosa JL, Torensma R, Turley H, Pulford K, Banham AH (2016) The European antibody network's practical guide to finding and validating suitable antibodies for research. *MAbs* 8(1): 27–36. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1100787>
2. Eden T, Menzel S, Wesolowski J, Bergmann P, Nissen M, Dubberke G, Seyfried F, Albrecht B, Haag F, Koch-Nolte F (2017) A cDNA immunization strategy to generate nanobodies

- 874 against membrane proteins in native conforma- 932
 875 tion. *Front Immunol* 8:1989. [https://doi.](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01989) 933
 876 [org/10.3389/fimmu.2017.01989](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01989)
- 877 3. Moller S, Jung C, Adriouch S, Dubberke G, 934
 878 Seyfried F, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F 935
 879 (2007) Monitoring the expression of purino- 936
 880 ceptors and nucleotide-metabolizing ecto- 937
 881 enzymes with antibodies directed against pro- 938
 882 teins in native conformation. *Purinergic Signal* 939
 883 3(4):359–366. [https://doi.org/10.1007/](https://doi.org/10.1007/s11302-007-9084-9) 940
 884 [s11302-007-9084-9](https://doi.org/10.1007/s11302-007-9084-9) 941
 885 4. Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, 942
 886 Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, 943
 887 Iacenda D, Knop JH, Hammel A, 944
 888 Bergmann P, Schwarz N, Assuncao J, 945
 889 Rotthier W, Haag F, Tolosa E, Bannas P, 946
 890 Boue-Grabot E, Magnus T, Laeremans T, 947
 891 Stortelers C, Koch-Nolte F (2016) Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel 948
 892 ameliorate inflammation. *Sci Transl Med* 949
 893 8(366):366ra162. [https://doi.org/10.1126/](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463) 950
 894 [scitranslmed.aaf8463](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463) 951
 - 896 5. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, 952
 897 Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, 953
 898 Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, 954
 899 Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Ser- 955
 900 reze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F 956
 901 (2009) Single domain antibodies: promising 957
 902 experimental and therapeutic tools in infection 958
 903 and immunity. *Med Microbiol Immunol* 959
 904 198(3):157–174. [https://doi.org/10.1007/](https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7) 960
 905 [s00430-009-0116-7](https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7) 961
 - 906 6. Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL (2018) 962
 907 Exploiting nanobodies' singular traits. *Annu* 963
 908 *Rev Immunol* 36:695–715. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053327) 964
 909 [10.1146/annurev-immunol-042617-053327](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053327) 965
 - 910 7. Muyldermans S (2020) A guide to: generation 966
 911 and design of nanobodies. *FEBS J* 288: 967
 912 2084–2102. [https://doi.org/10.1111/febs.](https://doi.org/10.1111/febs.15515) 968
 913 [15515](https://doi.org/10.1111/febs.15515) 969
 - 914 8. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, 970
 915 Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, 971
 916 Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) 972
 917 Naturally occurring antibodies devoid of light 973
 918 chains. *Nature* 363(6428):446–448. [https://](https://doi.org/10.1038/363446a0) 974
 919 doi.org/10.1038/363446a0 975
 - 920 9. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F (2017) 976
 921 Nanobodies and Nanobody-based human 977
 922 heavy chain antibodies as antitumor therapeu- 978
 923 tics. *Front Immunol* 8:1603. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603) 979
 924 [10.3389/fimmu.2017.01603](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603) 980
 - 925 10. Schutze K, Petry K, Hambach J, Schuster N, 981
 926 Fumey W, Schriewer L, Rockendorf J, 982
 927 Menzel S, Albrecht B, Haag F, Stortelers C, 983
 928 Bannas P, Koch-Nolte F (2018) CD38-specific 984
 929 Biparatopic heavy chain antibodies display 985
 930 potent complement-dependent cytotoxicity 986
 931 against multiple myeloma cells. *Front* 987
 932 *Immunol* 9:2553. [https://doi.org/10.3389/](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02553) 988
 933 [fimmu.2018.02553](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02553) 989
 - 934 11. Hambach J, Riecken K, Cichutek S, Schutze K, 990
 935 Albrecht B, Petry K, Rockendorf JL, Baum N, 991
 936 Kroger N, Hansen T, Schuch G, Haag F, 992
 937 Adam G, Fehse B, Bannas P, Koch-Nolte F 993
 938 (2020) Targeting CD38-expressing multiple 994
 939 myeloma and Burkitt lymphoma cells in vitro 995
 940 with Nanobody-based chimeric antigen recep- 996
 941 tors (Nb-CARs). *Cell* 9(2):321. [https://doi.](https://doi.org/10.3390/cells9020321) 997
 942 [org/10.3390/cells9020321](https://doi.org/10.3390/cells9020321) 998
 - 943 12. Eichhoff AM, Borner K, Albrecht B, Schafer W, 999
 944 Baum N, Haag F, Korbelen J, Trepel M, 1000
 945 Braren I, Grimm D, Adriouch S, Koch-Nolte 1001
 946 F (2019) Nanobody-enhanced targeting of 1002
 947 AAV gene therapy vectors. *Mol Ther Methods* 1003
 948 *Clin Dev* 15:211–220. [https://doi.org/10.](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.003) 1004
 949 [1016/j.omtm.2019.09.003](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.003) 1005
 - 950 13. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, 1006
 951 Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, 1007
 952 Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, 1008
 953 Kiyono H (2012) Extracellular ATP mediates 1009
 954 mast cell-dependent intestinal inflammation 1010
 955 through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 1011
 956 3:1034. [https://doi.org/10.1038/](https://doi.org/10.1038/ncomms2023) 1012
 957 [ncomms2023](https://doi.org/10.1038/ncomms2023) 1013
 - 958 14. Buell G, Chessell IP, Michel AD, Collo G, 1014
 959 Salazzo M, Herren S, Gretener D, 1015
 960 Grahames C, Kaur R, Kosco-Vilbois MH, 1016
 961 Humphrey PP (1998) Blockade of human 1017
 962 P2X7 receptor function with a monoclonal 1018
 963 antibody. *Blood* 92(10):3521–3528 1019
 - 964 15. Yokoyama WM (2001) Production of mono- 1020
 965 clonal antibodies. In: *Current protocols in cell* 1021
 966 *biology*. chapter 16:unit 16 11. [https://doi.](https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1601s03) 1022
 967 [org/10.1002/0471143030.cb1601s03](https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1601s03) 1023
 - 968 16. Adriouch S, Dubberke G, Diessenbacher P, 1024
 969 Rassendren F, Seman M, Haag F, Koch-Nolte 1025
 970 F (2005) Probing the expression and function 1026
 971 of the P2X7 purinoceptor with antibodies 1027
 972 raised by genetic immunization. *Cell Immunol* 1028
 973 236(1–2):72–77. [https://doi.org/10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.08.011) 1029
 974 [cellimm.2005.08.011](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.08.011) 1030
 - 975 17. Yeo C, Saunders N, Locca D, Flett A, 1031
 976 Preston M, Brookman P, Davy B, Mathur A, 1032
 977 Agrawal S (2009) Ficoll-Paque versus Lym- 1033
 978 phoprep: a comparative study of two density 1034
 979 gradient media for therapeutic bone marrow 1035
 980 mononuclear cell preparations. *Regen Med* 1036
 981 4(5):689–696. [https://doi.org/10.2217/](https://doi.org/10.2217/rmc.09.44) 1037
 982 [rmc.09.44](https://doi.org/10.2217/rmc.09.44) 1038
 - 983 18. Jager V, Bussow K, Wagner A, Weber S, 1039
 984 Hust M, Frenzel A, Schirrmann T (2013) 1040
 985 High level transient production of recombi- 1041
 986 nant antibodies and antibody fusion proteins 1042
 987 in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 13:52. 1043
 988 <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-52> 1044

- 989 19. Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ (2006) posttransfection improves recombinant protein 998
 990 Production and characterization of adeno- synthesis. *Biotechnol Bioeng* 90(3):332–344. 999
 991 associated viral vectors. *Nat Protoc* 1(3): <https://doi.org/10.1002/bit.20428> 1000
 992 1412–1428. [https://doi.org/10.1038/nprot.](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.207)
 993 [2006.207](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.207)
- 994 20. Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, 1001
 995 St-Laurent G, Bisson L, Kamen A, Durocher Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES 1002
 996 Y (2005) Transient gene expression in (1997) Increasing the serum persistence of an 1003
 997 HEK293 cells: peptone addition *IgG fragment by random mutagenesis. Nat* 1004
Biotechnol 15(7):637–640. <https://doi.org/10.1038/nbt0797-637> 1005
 1006

Uncorrected Proof

Author Queries

Chapter No.: 6 498690_1_En

Query Refs.	Details Required	Author's response
AU1	Please check and confirm if the affiliations are presented correctly.	
AU2	Please check and confirm if the footnote is presented correctly.	

Uncorrected Proof

Article 2, Publication

Administration of an AAV vector coding for a P2X7 blocking nanobody-based biologics ameliorates colitis in mice

Catalina Abad*, Mélanie Demeules*, Charlotte Guillou, Henri Gondé, Rachid Zoubari, Yossan-Var Tan, Valérie Vouret-Criaviari, Friedrich Koch-Nolte, Sahil Adriouch

Contexte de l'étude. Un rôle de l'ATPe est suggéré dans l'inflammation et notamment dans les maladies inflammatoires de l'intestin. P2X7 est exprimé sur les cellules immunitaires et non immunitaires du tractus gastrointestinal. On observe une surexpression de P2X7 dans l'épithélium et la lamina propria de la maladie de Crohn suggérant son rôle dans la pathogénèse de la maladie. Il a été montré que des souris déficientes pour P2X7 présentaient une diminution de l'inflammation dans les modèles DSS et TNBS. Une étude de Hofman et collaborateurs a également mis en évidence que le blocage de P2X7 augmentait la carcinogénèse (Hofman et al. 2015).

Méthode. Pour étudier le rôle de P2X7 dans l'inflammation aiguë et chronique de l'intestin, nous avons injecté les rAAVnano bloquants et potentialisateurs de P2X7 puis trois semaines après réalisé le modèle DSS de colite intestinale. Pour étudier le rôle de P2X7 dans la carcinogénèse associée à l'inflammation chronique de l'intestin nous avons injecté de les rAAV trois semaines avant l'injection d'azoxyméthane (AOM) puis réalisé le premier cycle de DSS une semaine après.

Principaux résultats.

- Nous avons testé différentes constructions basées sur des nanobodies dans deux formats différents (DimHLE ou hcAb). Nous avons sélectionné deux constructions basées sur des nanobodies, 13A7-Fc antagoniste et 14D5-dimHLE potentialisateur de P2X7 pouvant moduler ce récepteur au long terme.
- L'injection du rAAV 13A7-Fc permet de diminuer le score clinique de la colite induite par le DSS.
- 13A7-Fc diminue également le score histopathologique du colon ainsi qu'une baisse d'expression de multiples chemokines et cytokines proinflammatoires.
- Nous avons testé le modèle de carcinogénèse associée à la colite inflammatoire chronique. Cependant en utilisant différentes conditions notamment la dose d'Azoxymethane (AOM) ou différents temps de sacrifice, nous n'avons pas pu obtenir de résultats significatifs.

Administration of an AAV vector coding for a P2X7 blocking nanobody-based biologics ameliorates colitis in mice

Catalina Abad*¹, Melanie Demeules*¹, Charlotte Guillou¹, Henri Gondé¹, Rachid Zoubari¹, Yossan-Var Tan¹, Valérie Vouret-Craviari^{2,3,4}, Friedrich Koch-Nolte⁵, Sahil Adriouch¹

1. Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies, Rouen, France.
2. Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, Nice, France
3. FHU OncoAge, Nice, France
4. Centre Antoine Lacassagne, Nice, France
5. Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

*Both authors contributed equally to this study

Keywords: Adeno-associated virus; Nanobodies (V_HH); P2X7; animal models; colitis.

Abbreviations: AAV: adeno-associated virus; eATP: extracellular ATP; DSS: dextran sodium sulfate; HLE: Half-life extended; IBD: inflammatory bowel disease; Nb: nanobodies; Treg: regulatory T cells

Bullet point summary:

What is already known

- P2X7 exerts proinflammatory actions by activating the NLRP3 inflammasome in myeloid cells
- P2X7 is a potential target in inflammatory diseases
- Nanobodies with agonistic and antagonistic properties against P2X7 have been developed
- AAV vector represent safe and efficient vector for gene transfer in vivo

What this study adds

- A novel methodological approach based on AAV vector coding for selected agonistic or antagonistic nanobody-based biologics to validate potential pharmacological targets in vivo
- Administration of AAV vectors coding for selected nanobody-based biologics targeting P2X7 leads to their prolonged and stable production in vivo and to long-term modulation of P2X7 functional activity in vivo
- A single intramuscular injection of an AAV vector coding for a nanobody-based biologics designed to inhibit P2X7 ameliorates DSS-induced colitis in mice

Clinical significance

- The present study validate the importance of P2X7 as a relevant target in inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease (IBD)
- The study highlight the pharmacological potential of nanobody-based constructs as a new class of biologics that can be used to modulate target function in vivo

Abstract

Background and Purpose: The ATP-gated P2X7 receptor is widely expressed by immune cells, and exert proinflammatory properties at least in part through the activation of NLRP3 inflammasome in myeloid cells. Nanobodies targeting P2X7, with agonistic or antagonistic properties, have been developed and can be used to modulate (i.e., block or potentiate) P2X7 function in vitro as well as in vivo. AAV mediated gene transfer represent a novel methodological approach to achieve long-term in vivo expression of selected nanobody-based biologics targeting P2X7 with the aim to validate its pharmacological importance as a target. Such a methodological approach, termed AAVnano, was used here to validate the relevance of P2X7 as a target in acute as well as in chronic dextran sodium sulfate (DSS) induced colitis in mice.

Experimental Approach: Mice received a single intramuscular (i.m.) injection of AAV vector coding for either an agonistic (14D5-dimHLE) or an antagonistic (13A7-Fc) nanobody-based construct targeting P2X7. Confirmation of the functional long-term inhibition or potentiation of P2X7 functions were evaluated ex vivo from blood samples. DSS treatments were used to induce acute colitis in different group of mice injected or not with the AAV vectors coding for 14D5-DimHLE or 13A7-Fc nanobody-based constructs. Severity of colitis, clinical symptoms, colon histopathology, and chemokine and cytokine expressions, were determined over time in each group to evaluate the impact of P2X7 modulation on the clinical scores.

Key Results: We found that a single i.m. injection of AAV vector coding for the antagonistic (13A7-Fc) or agonistic (14D5-dimHLE) nanobody efficiently modulates P2X7 function *in vivo* from day 15 and until, at least, 120 days post-AAV injection in a dose-dependent manner. Administration of AAV vector coding for the P2X7-blocking nanobody-based construct 13A7-Fc, significantly ameliorated DSS-induced colitis, and colon histopathology, and significantly reduced immune cell infiltration, as well as chemokine and proinflammatory cytokines expression in the colonic tissues.

Conclusion and Implications: Our results demonstrate the validity of the AAVnano methodological approach to either inhibit or potentiate P2X7 functions *in vivo* and to evaluate its role pathophysiological models. Applying this method to the DSS-induced colitis, we demonstrate that blockade of P2X7 with an antagonistic nanobody-based biologics reduced inflammation and disease severity. Hence, this study confirm the importance of P2X7 as a pharmacological target, and additionally suggest the use of nanobody-based biologics as an alternative treatment in inflammatory bowel disease.

Introduction

Purine nucleotides release in the extracellular compartment, such extracellular ATP (eATP), can act as potent signaling molecules that regulate several physiological processes including the immune system. Whereas eATP levels remain low in homeostatic conditions, its concentration can rapidly increase in situation of cell stress or cell damage, and act as a danger associated molecular pattern (DAMP) engaging an immune response. Indeed, eATP has recently emerged as a key signaling molecule mediating different aspects of innate and adaptive immunity (1, 2). eATP acts notably through the purinergic P2X7 receptor, a ligand-gated ion channels belonging to the purinergic type 2 receptor family (P2). P2X7 receptors are largely expressed by lymphoid and myeloid immune cells (3). On murine T lymphocytes, P2X7 activation induces metalloprotease-driven shedding of CD62L (4) and CD27 (5), and leads to regulatory T cell (Treg) death (6). On myeloid cells such as macrophages and dendritic cells, P2X7 elicits inflammasome activation, and the subsequent maturation and release of mature IL-1 β and IL-18 proinflammatory cytokines (7).

Multiple evidences suggest a role of eATP in the pathogenesis of inflammatory diseases including inflammatory bowel disease (IBD). P2X7 is expressed on immune and non-immune cells of the gastrointestinal tract (8, 9). Up-regulated P2X7 expression has been reported in the colon epithelium and in the lamina propria (macrophages and dendritic cells) of Crohn's disease patients, suggesting its role in the disease pathogenesis (10). Similarly, the expression of P2X7 has been reported to be increased in rats subjected to the acute model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis (11). It has been previously shown that P2X7 deficient mice exhibited reduced mucosal inflammation in both DSS and trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) models of colitis (10, 12). This agrees with the purported proinflammatory actions of P2X7, and supports its role in the development of intestinal inflammation. Moreover, this suggests that targeting P2X7 may constitute a novel therapeutic target in inflammatory diseases such as IBD. Despite the development of several small-molecule P2X7 inhibitors (13), their use is hampered sometimes by their low specificity, their undesirable side effects, and their short half-life *in vivo* due to their metabolism into inactive or toxic products.

Antibodies constitute important tools for experimental research and medical applications. Most antibodies are composed of two heavy and two light chains and both chains contribute to the antigen-binding site. Nevertheless, llamas and other camelids can also produce antibodies composed only of heavy chains (14). The single antigen-binding domain of these antibodies is designated V_HH or, when produced as a recombinant protein, nanobody (Nb) or single domain antibody. Nanobodies that block (13A7) or activate (14D5) gating of the P2X7 ion channel have been successfully developed (15). The efficacy of direct administration

of these nanobodies *in vivo* has been demonstrated, since systemic injection of recombinant 13A7-based biologics in mice blocked P2X7 activation on T cells and macrophages and ameliorated experimental glomerulonephritis and allergic contact dermatitis (15). Yet, injections every three days were necessary to maintain sufficient concentrations of the nanobody in blood. Here, we have used an alternative adeno-associated virus (AAV)-based methodology as a delivery vector for *in vivo* gene transfer of the transgenic sequence coding for selected P2X7-targeting nanobody-based biologics. With this strategy, termed AAVnano, we were able to ensure the continuous presence of efficient concentration of the selected nanobody-based biologics *in vivo*, even in the long-term, and until at least 120 days post AAV administration. We first aimed to identify and characterize AAV vectors coding for selected nanobody-based biologics able to either block or potentiate P2X7 function. One AAV was selected for its capacity to potently and durably inhibit P2X7 (i.e., coding for 13A7-Fc biologic), and one for its capacity to potentiate P2X7 functions *in vivo* (i.e., coding for 14D5-DimHLE biologic). This approach offers the unique opportunity to directly address P2X7 function *in vivo*, in different pathophysiological situations, in any given mouse genetic background, without the need to use genetically-manipulated animals, or repeated small-molecule injections for which the pharmacokinetic profile is not always sufficiently characterized. In addition, this approach allowed not only to inhibit P2X7 (i.e., using AAV-13A7-Fc), a frequent aim of published study, but also to potentiate its function (i.e., using AAV-14D5-DimHLE) which may aggravate the disease and thereby indirectly confirm P2X7 implication in the studied pathophysiological process. Additionally, we aimed to reevaluate P2X7 contribution to the pathological inflammatory situation induced by dextran sodium sulfate (DSS) administration, as a model of colitis. In this model, we found that a single injection of AAV-13A7-Fc significantly reduced DSS-induced colitis, and inhibit immune cell infiltration and inflammatory cytokines production. In conclusion, our data confirm the importance of P2X7 as a pharmacological target, and additional suggests that a therapeutic strategy based on nanobody-based biologics targeting P2X7 may be beneficial for the treatment for IBD, and potentially for other chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 8-week old female mice (Janvier Laboratories) were used in these studies. The animal experimental protocol was approved by the by the French Ministry of Education and Research, after consultation with an ethical committee (n° APAFIS # 8172-2017042111149104 v2). AAVnano were administered through a single i.m. injection under ketamine/xylazine anesthesia in a total volume of 100 μ l (25 μ l per injection site, in gastrocnemius muscle). Concerning the DSS model of acute colitis, animals were checked daily for signs of suffering and were euthanized if weight loss was >20%, or if hunching posture, shivering, lack of movement or cold temperature were observed. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals.

Generation of the AAV vector coding for the nanobody-based biologics

The construct 14D5-dimHLE used in this study was based on nanobody dimers (“dim” format) fused to the Alb8 anti-albumin nanobody (half-life extended “HLE” format). 14D5-dimHLE was constructed by fusing the coding sequences of two 14D5 nanobodies using a 35-GS linker (GGGGS)⁷. These homodimeric bivalent constructs were then fused to the anti-albumin nanobody Alb8 via a 9-GS linker (GGGGSGGGS) (16). The P2X7-blocking 13A7-IgG1LSF hcAb was constructed by fusing the nanobody 13A7 to the hinge region and Fc region of a mutated mouse IgG1 antibody carrying the “LSF” mutations (T252L, T254S, T256F) (17).

For the production of AAV, all constructs were cloned into a pFB plasmid under the control of a CBA promoter (for AAV1 constructs coding for 14D5-dimHLE and 13A7-Fc). Production, purification, and titration of AAV1 were performed by Virovek (Hayward, California, USA) using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells. For muscle transduction, mice hind legs were shaved under anesthesia and 100 μ L diluted AAV were injected into 4 gastrocnemius or quadriceps muscle sites to reach a total dose of 10^{11} viral genomes (vg) per mouse.

Evaluation of the blocking or potentiating capacity of the nanobody-based biologics produced in vivo

Agonistic or antagonistic nanobody functionality was determined *ex vivo* by evaluating ATP induce and P2X7-depend shedding of CD62L or/and CD27 at the surface of lymphocytes by flow cytometry. Briefly, blood samples were collected in EDTA-containing tubes, and peripheral blood mononuclear cells were treated with or without ATP (at doses ranging from 150 to 600 μ M depending on the study) in PBS for 15 min at 37°C. For some studies, similar experiments

were performed with splenocytes obtained after spleen dissociation and filtration through a 40 μ m cell-strainer. After incubation with ATP, cells were washed with PBS 3% FBS and stained with a mix containing anti- CD4-APC-Cy7, CD25-PE, CD8a-PE-Cy7, CD62L-FITC, CD27-APC antibodies for 30 min at 4°C. Cells were washed with PBS 3% FBS and treated to lyse the erythrocytes and to fix the cell at the same time. For that, cell were incubated with RBC Lysis/Fixation Solution (Sony) buffer for 30 min at room temperature before washing and analysis with an LSRFortessa (BD Biosciences) cytometer.

Titration of the nanobody-based biologics produced in vivo

Nanobody serum levels were titrated by flow cytometry as follows. B16F10 cells transduced to stably express P2X7, were used as a target cell in vitro (B16F10-P2X7). Cells were incubated with TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) (Sony) for 15 min at 4°C, followed by 30 min further incubation with 15 μ l of diluted serum collected from mice injected with the AAV vector coding for selected nanobody-based biologics. After washing with PBS 3% SVF, 13A7-Fc biologic bound at the surface of B16F10-P2X7 cells were detected using a biotinylated antibody directed against the Fc moiety (anti-mouse IgG1, Sony) for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed and incubated with streptavidin-PE (Sony) for 30 min at 4°C. For detection of 14D5-dimHLE at the surface of B16F10-P2X7 cells, a biotinylated antibody directed against the anti-albumin nanobody was used (mAb77). Cells were analyzed with an LSRFortessa (BD Biosciences) cytometer. Calculation of the concentration of each nanobody-based construct contained in the sera was performed by comparison to a standard curve obtained after serial dilution of the same recombinant construct obtained and purified from transiently transfected HEK-293 cells.

Colitis induction following administration of dextran sodium sulfate

Mice received an i.m. injection of either PBS, 10^{11} vg (viral genome) of AAV-13A7-Fc, or 10^{11} vg of AAV-14D5-DimHLE. Three weeks later, acute inflammation was induced by administration of 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) in the drinking water from days 1 to 5, after which they were switched to regular water. The disease activity index (DAI), was evaluated on a daily basis by two independent researchers blinded to the treatment, following a scoring system from 0 to 10 reported in (12). DAI was calculated by the addition of three different clinical scores: (1) Body weight loss, which was scored from 0 to 4 (0, no loss; 1, loss < 5%; 2, loss < 10%; 3, loss < 20%; 4, loss > 20%); (2) Stool consistency, from 0 to 3 (0, normal; 1, loose stools; 2, watery diarrhea; 3, severe watery diarrhea); (3) Presence of rectal bleeding, from 0 to 3 (0, no blood; 1, presence of petechia; 2, traces of blood in the stools; 3, bleeding). Mice were sacrificed on day 13, and colons, mesenteric lymph nodes and spleens

were collected for further mechanistic studies. Colons were washed and divided in three portions as follows: starting from the proximal colon, 0.5 cm of tissue was collected for RNA studies, the next 0.5 cm for explant cultures, and the rest was rolled using the “Swiss Roll” technique and fixed overnight in 4% paraformaldehyde for histological studies.

Histopathological evaluation

Tissues were transferred to 70% ethanol and progressively dehydrated for paraffin embedding. Seven- μ m paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological inflammation was scored in a blinded fashion from 0 to 10 according to four cumulative parameters: (1) severity of inflammation, from 0 to 3 (0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe), (2) extent of inflammation from 0 to 3 (0, none; 1, mucosa; 2, mucosa and submucosa; 3, transmural), (3) crypt damage from 0 to 3 (0, none; 1, basal to 1/3; 2, basal to 2/3; 3, crypt loss, crypts, and epithelium loss), and percentage of tissue affected by inflammation from 0 to 4 (0, 0%; 1, 25%; 2, 50%; 3, 75%; 4, 100%).

Real time RT-PCR

RNA was isolated from colons with Trizol reagent (Sigma) and retrotranscribed with the ImProm-II™ transcription system from Promega. Real time quantitative PCRs were performed using the Lightcycler 480 SYBR Green I Master (Roche). Primers are listed in Supplementary Table 1. Amplification was performed with a LightCycler 480 System SW 1.5.1 (Roche) as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 30 s followed by 60 °C (for CCL2, CXCL9, IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-22 and TGF β) or 62 °C (for CXCL10) for 30 s, and 72 °C for 30 s. Melting curve analysis confirmed primer specificity. The calculation was normalized to the housekeeping gene Eef2 according to the formula $(E_{\text{target}})^{\Delta C_t} / (E_{\text{normalizer}})^{\Delta C_t \text{ normalizer}}$ (Real-time PCR handbook from Life Technologies).

Colon explant cultures

Colon samples were excised longitudinally, rinsed in PBS and incubated in 0.8 ml of RPMI 1640 medium with 10% FBS and 1% penicillin and streptomycin in 24-well plates for 16 hours. Supernatants were collected and stored at -20°C for cytokine evaluation by ELISA.

Statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (18). Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-Way ANOVA was used for statistical analysis of DAI curves. For all other analysis, the Student's t-test test

was used. For all, statistical significance was considered as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.0.

Results

Evaluation in vivo of different nanobody-based biologics directed against P2X7 using the AAVnano methodological approach

Different nanobodies targeting P2X7 have been generated and selected for their ability to block or to potentiate P2X7 functions (16). We selected three nanobody clones demonstrating an antagonist effect in vitro (i.e., clones 13A7, 1C81, 8G11) and one showing a potentiating effect (i.e., clone 14D5). As a first step in this study, we aimed to select among these clones the nanobody-based biologics offering the highest capacity to either inhibit, or conversely to potentiate, P2X7 functions in vivo. Nanobodies display a limited in vivo persistence, due to their small size and to the lack of an Fc-region that allow classical antibody half-life extension (HLE) through the binding to neonatal Fc receptor (FcRn). Thus, we generated two types of constructs to increase their half-life and their avidity to the target. In one type of construct, the selected nanobody is fused to the hinge and to the mutated Fc-region of a mouse IgG1 carrying the “LSF” mutations (T252L, T254S, T256F), which were shown to confer a higher affinity to the neonatal Fc receptor (FcRn), (16, 19). In the second type of construct, we used a dimer of the selected nanobody, fused to an albumin-specific nanobody conferring indirect binding to FcRn, thereby also contributing to their half-life extension (HLE) (16, 19). The corresponding genetic sequences, coding for these two types of constructs termed respectively, nano-Fc or nano-DimHLE, were used to generate recombinant AAV vectors coding for the nanobody-based biologics that we studied (**Fig. 1A**). In a first screening phase, we generated and evaluated in vivo 4 different AAV coding each for a different nano-Fc constructs targeting P2X7 (i.e., 13A7-Fc, 14D5-Fc, 1C81-Fc and 8G11-Fc). For that, the AAV were administrated i.m. at a dose of 10^{11} gv/mouse, and the functional consequences on P2X7 modulation by the encoded nano-Fc biologics expressed in vivo were evaluated. As a sensitive readout of P2X7 functional activity, we used its known effect on the activation of metalloproteases resulting in the rapid release of membrane proteins from the surface of peripheral blood lymphocytes, akin to CD62L or CD27 (6, 20). Blood samples were collected 15 days post AAV injection, treated with ATP ex vivo, and P2X7-dependant shedding of CD62L was evaluated by flow cytometry. The results indicate that AAV coding for 13A7-Fc or 1C81-Fc efficiently block P2X7 functional activity, while AAV coding for 8G11-Fc was associated with an only partial inhibitory effect (**Fig. 1B**). Unexpectedly, while the nanobody 14D5 was initially found to potentiate P2X7 in vitro, the 14D5-Fc construct expressed in vivo upon AAV-mediated gene-transfer, was found instead to exert partial antagonistic activities (**Fig. 1B**).

Because administration of AAV vector coding for 14D5-Fc led to partial inhibition rather than potentiation of P2X7 function, we evaluated whether a construct based on the nano-

DimHLE format could restore the potentiating effect observed in vitro with the original 14D5 nanobody. We thus generated AAV vector coding for 14D5-DimHLE as well as a vector coding for 13A7-DimHLE for comparison. Mice were again injected with the different AAV vectors and blood samples were collected 17 days after for evaluation of P2X7 function *ex vivo* on T cells. Data first demonstrated that the AAV coding for the 13A7-Fc construct more potently blocks P2X7 function than the one coding for 13A7-DimHLE, suggesting that the format indeed influence in vivo potency. The data also reveal that the AAV coding for 14D5-DimHLE now exert a potentiating effect on P2X7 activity, as initially aimed (**Fig. 1C**). However, as the assay was performed with near saturating doses of ATP, the potentiating effect of 14D5-DimHLE was barely visible in this condition. To better evaluate this point, we performed the experiment again, but with a low 30 μ M dose of ATP and analysed the shedding of CD62L and CD27 in all CD8⁺, CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells subsets. Data confirmed as expected that the potentiation effect could better be demonstrated with the low ATP concentration, suggesting that P2X7 triggers in vivo would similarly be facilitated by 14D5-DimHLE at low ATP concentrations (**Fig. 2 A-B**). Collectively, based on these results we selected AAV-13A7-Fc as the best AAV candidate to suppress P2X7 function in vivo and AAV-14D5-DimHLE as a potent potentiating AAV vector.

Evaluation of the AAV dose required to block P2X7 function in vivo

Next, we evaluated the dose-response dependency in our AAVnano methodological approach. For that, we focused here on the AAV-13A7-Fc vector as complete inhibition of P2X7 function probably require saturating dose of the nanobody-based biologics, while partial versus full potentiation is more difficult to distinguish. With that aim, different doses ranging from 3×10^9 vg to 1×10^{11} vg per mouse of AAV-13A7-Fc were again injected i.m. and blood samples were collected 15 days later to evaluate the ATP-induced shedding of CD62L on the surface of CD4⁺ T cells. The results demonstrate that complete blockade of P2X7 function can be achieved at vector doses above 3.3×10^{10} vg/mouse (**Fig. 3**). To confirm these results, a similar experiment was performed that included higher doses of ATP, and analyses were extended to CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. Also, these analyses were performed at a later time point (84 days post-AAV injection), to evaluate the durability of P2X7 blockade in vivo. The results confirmed the initial dose-response profile, with a complete P2X7-blockade at AAV-doses above 1×10^{10} vg/mouse (supplementary **Fig. S1 + S2**). Remarkably, we observed that the CD8⁺ as well as CD4⁺ T cells collected from AAV-13A7-Fc injected mice were resistant to even very high concentration of ATP (i.e., up to 600 μ M ATP), confirming the high level of P2X7-inhibition obtained with this methodological approach. From this dose-response study, we chose to inject the saturating AAV dose of 1×10^{11} vg per mouse in all subsequent studies.

Evaluation of the blocking and potentiating effect in vivo overtime and titration of the concentrations of nanobody-based biologics reached in vivo following a single injection of AAVnano vector

To further characterize our methodological approach, we then determined the effects of 13A7-Fc and 14D5-DimHLE overtime. For that, the corresponding AAV vectors were injected i.m at a vector dose of 10^{11} gv/mouse, and blood samples were collected at different time points (i.e. 17, 30, 87 and 107 days post AAV-injection) to evaluate ex vivo the biological effects of the construct on P2X7 activity on T cells. The blocking potential of 13A7-Fc were evaluated and compared to the ATP-untreated T cells collected from untransduced control mice. Data confirmed the complete blockade of P2X7 at almost all the time points analyzed suggesting a durable effect of the nanobody-based biologics in vivo (**Fig. 4A**, left panel). As a confirmation of the potent blocking effect of 13A7-Fc on P2X7 function, we next thought to compare with P2X7^{-/-} mice. For that, some of the mice were kept until day 120 post AAV-injection, a time point where the animal were killed and the splenocytes were collected. Cells were treated ex vivo with 150 μ M of ATP and P2X7 function was then evaluated on these cells and compared with the splenocytes collected from P2X7^{-/-} mice. The data demonstrate that the functional inhibition of P2X7 obtained 120 days post AAV-13A7-Fc is not different from what observed with cells from the P2X7^{-/-} mice (**Fig. S3**).

We also evaluated the potentiating effect of 14D5-DimHLE overtime on P2X7 function on T cell, in two different experiments. In the first set of experiment, we evaluated the increase of P2X7 activity when cell were treated with the high dose of 150 μ M of ATP. In the second set of experiment, the dose of 30 μ M was used to better evaluate the increase of sensitivity to low doses of ATP. In both experiments, data were normalized to the results obtained in untransduced control mice treated with the same corresponding high or low doses of ATP (**Fig. 4A**, middle and right panels). The data confirmed the potentiating effect of 14D5-DimHLE in the activity of P2X7 by a factor of around 1.5 when evaluated with the high dose of ATP (**Fig. 4A**, middle panel), and by a factor raising from about 3 to 6 when evaluated with the low dose of ATP (**Fig. 4A**, right panel).

Next, we evaluated the levels of the nanobody-based biologics reached in vivo at different time points. For that, 10^{11} gv/mouse of AAV-13A7-Fc or AAV-14D5-DimHLE were injected i.m. and the plasmas were collected over time for more than 100 days. The concentration of unbound nanobody-based biologics contained in these samples were evaluated using a flow cytometric assay. For that, a P2X7-expressing cell line was used to capture the nanobody-based biologics contained in the diluted sera, and the concentrations were determined by comparison with a standard titration curve. Data revealed that nanobody-

based biologics concentrations reach around 30 µg/ml at day 17 post AAV injections, and increase over time to reached a plateau around 100 µg/ml between days 30 to 60, that is maintained over time until experiment termination at day 115. These data are well in agreement with the notion that the AAVnano methodological approach lead to a continuous production of the nanobody-based biologics for several months *in vivo*, with a relatively constant pharmacokinetic, contrasting with what is usually obtained using repeated injections of the recombinant biologics.

Importantly, no conspicuous changes were noticed in the frequency of T cells subsets overtime, in the different control and AAV-injected groups, suggesting that the nanobody-based biologics evaluated here does not induce depletion of the target cells (not shown). Hence, these data collectively indicate that the nanobody-based biologics expressed *in vivo*, following AAV-mediated gene transfer, are well tolerated *in vivo*, durably express, and potentially modulate (block or potentiate) the function of P2X7.

AAV-13A7-Fc ameliorates the clinical and histopathological features of DSS-induced colitis

P2X7 participates in the inflammatory response by activating the NLRP3 inflammasome that leads to caspase 1 activation and IL-1 β and IL-18 maturation and release. In order to investigate the ability of AAV-13A7-Fc vs AAV-14D5-dimHLE to modulate inflammation *in vivo*, we used the model of acute colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). Mice were received a single i.m. injection of AAV coding for the nanobody-based biologics, and three weeks later they were given 2.5% DSS in the drinking water for five days followed by eight days of regular water. We observed that the disease activity index (DAI) progressively increased upon DSS administration in both untreated and treated mice until day 7 post-DSS treatment, with no difference among groups (**Fig. 5A**). Remarkably, from this time point, the DAI of AAV-13A7-Fc treated mice remained significantly lower compared to PBS- or AAV-14D5-dimHLE-mice. Mice injected with AAV-14D5-dimHLE exhibited a trend toward an enhanced disease as compared to untreated mice, but this was not statically significant, possibly reflecting an already very high level of inflammation. Comparing the 3 groups of mice, the cumulative DAI score from day 8 was 10.85 ± 2.29 in AAV-13A7-Fc treated mice vs 16.75 ± 3.02 in control mice and 18.90 ± 2.40 in AAV-14D5-dimHLE treated mice. In correlation with the clinical data, colon length reduction and signs of inflammation (redness and swelling) were macroscopically observed upon 13 days of DSS treatment in PBS-treated mice and these were ameliorated by the AAV-13A7-Fc treatment and slightly worsened by AAV-14D5-dimHLE (**Fig. 5B**). At microscopic level, colons from DSS-treated mice exhibited mucosal and submucosal immune cell infiltration and focal crypt damage with goblet cell loss (**Fig. 5C**). These

histopathological features of intestinal inflammation were significantly reduced in AAV-13A7-Fc-injected mice. Indeed, the average histopathological score was of 3.75 ± 0.79 for PBS-treated mice vs 1.63 ± 0.32 for AAV-13A7-Fc-treated mice (**Fig. 5C**). AAV-14D5-dimHLE treatment did not significantly worsen this score, with nonetheless a trend to be higher than in untreated mice (4.4 ± 1.11). Of notes, protective effects of AAV-13A7-Fc on clinical and histopathological scores were observed even when a higher dose of DSS (3%) was used, suggesting that even higher levels of inflammation could be treated using biologics that block the P2X7 pathway (supplementary **Fig. S4**).

AAV-13A7-Fc protects from CD62L and CD27 shedding *in vivo* even

As a readout of the ability of our AAVnano strategy to modulate P2X7 activity before and after disease induction, we evaluated the shedding of CD27 and CD62L on peripheral blood lymphocytes from AAV-13A7-Fc and AAV-14D5-dimHLE injected mice, induced by exposure to 150 μ M ATP *ex vivo*. In PBS-injected mice, ATP treatment dramatically reduced the percentage of CD62L⁺CD27⁺ cells within the CD4⁺, CD8⁺ and Treg (CD4⁺CD25⁺) populations compared to cells not exposed to ATP (**Fig. 6A**). As expected, lymphocytes from AAV-13A7-Fc-injected mice were protected from ATP-induced CD27 and CD62L shedding in agreement with our previous experiments. Importantly, this protective effect was maintained after DSS-treatment suggesting that the *in vivo* production of 13A7-Fc biologics is not affected by the intense inflammatory status induced by DSS administration (**Fig. 6A**). To further validate this point, we additionally evaluated the concentration of the 13A7-Fc biologics in the sera collected from the DSS-treated animals. Data confirmed that the concentrations of unbound 13A7-Fc found in the circulation were maintained above 30 μ g/ml and were not significantly affected by DSS-treatment (**Fig. 4B**). As to the situation concerning the functional effect and the concentration of the 14D5-dimHLE biologics, our data confirmed a slightly potentiating effect of this biologics in the experimental condition used, and an even higher production of this biologics in the circulation, even after DSS treatment (**Fig. 6A-B**).

AAV-13A7-Fc reduces chemokine and proinflammatory cytokine expression in the colons from DSS-treated mice

DSS is thought to induce intestinal inflammation through the disruption of the intestinal epithelium, enabling the entry of luminal bacteria and associated antigens into the mucosa leading to an inflammatory response (21). Immune cells, recruited by means of locally produced chemokines, produce a wide range of proinflammatory mediators amplifying the immune response and leading to tissue damage. Indeed, colon expression of the chemokines CXCL9, CXCL10 and CCL2 and the proinflammatory cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 and IL-22 was significantly elevated in DSS-treated mice compared to untreated mice (**Fig.**

7A). In agreement with our clinical data and histological analysis, i.m. administration of AAV-13A7-Fc reduced the mRNA expression of all these chemokines and cytokines except for IL-18. AAV-14D5-dimHLE-treated mice had a trend to higher expression of IL-1 β , IL-6 and IL-17 in line with our initial hypothesis, but also display a trend to a reduced expression of all other molecules.

As P2X7 is known to promote inflammation by activating the NLRP3-inflammasome, and participate thereby not only in the maturation of IL-1 β and IL-18 that occurs in the cytoplasm, but also in their release to the extracellular compartment. Therefore, we thought to additionally evaluate the levels of these cytokines, at the protein level, in culture supernatants of colon explants. In agreement with P2X7 inhibition and amelioration of the disease, we observed a reduction in the levels of these cytokines in AAV-13A7-Fc injected mice as compared to the PBS control group (**Fig. 7B**).

Discussion

Recombinant AAV vectors represent efficient tools to produce therapeutic proteins in vivo, both in animal models as well as in humans (22). Transgenes transferred using AAV vectors persist for months in episomal forms (i.e. unintegrated extrachromosomal forms), considerably limiting the risk of mutational insertion as compared to other types of vectors. Additionally, their lack of pathogenicity, their physical stability and their ability to infect nondividing cells, render AAV vectors ideal for efficient gene transfer in animal models and in the clinic. Compared to other viral vectors, AAV vectors are less immunogenic than adenovirus vectors, are as easily produced and titrated as lentivirus vectors and - as non-pathogenic and non-replicative dependoviruses - are safer to manipulate than adenovirus or lentivirus vectors. Additionally, a variety of capsid serotypes offer the possibility to selectively target tissues of interest. For instance, AAV1 displays a high transduction efficiency and tissue selectivity for skeletal muscle, AAV8 for muscle and liver, and AAV9 for brain. Recently, it was shown that AAV-mediated gene transfer into muscle can be used to induce the systemic secretion of broadly-neutralizing antibodies against the human immunodeficiency virus (HIV), thereby protecting humanized-mice against HIV infection (23, 24). This approach, named “vectored immunoprophylaxis” (VIP), induced the appearance and persistence (months) of anti-HIV antibodies in the circulation of mice that had received a single i.m. injection of AAV1 vector coding for the selected antibody. A second study confirmed the efficiency and feasibility of the VIP strategy to confer durable protection also against influenza infection in mice (23). Here, we adapted this methodological approach with the aim to induce long-term expression of nanobody-based biologics, selected for their remarkable propensity to either fully blocks (13A7-Fc), or to potentiate (14D5-DimHLE), P2X7 function in vivo. We demonstrate that AAV1-

mediated gene transfer into muscle cells, following a single i.m. injection of our AAV vectors, was sufficient to drive sufficient expression of nanobody-based biologics in vivo to modulate P2X7 function in vivo in a time window ranging from 2 weeks to at least 4 months post AAV-injection. We believe that this methodological approach not only may serve to validate the importance of P2X7 as a target in a variety of pathophysiological context where P2X7 is involved, but also may serve for screening different format of nanobody-based biologics that may be developed for translational application in human. Interestingly, a recently described floxed humanized P2X7 receptor knock-in mouse model has been generated, that may be useful for such a screening strategy (25).

Whereas healthy tissues contain minimal levels of extracellular nucleotides and nucleosides, these augment in certain conditions such as hypoxia, ischemia, inflammation, or cancer. In this sense, it has been shown that eATP is released in colon tissues during DSS-induced colitis in mice (26). Indeed, it was shown that the levels of eATP progressively increased from day 3 upon treatment with 4% DSS, with the highest levels on day 7. Interestingly, we started to observe a protection from DSS-induced disease at a clinical level by AAV-13A7-Fc only from day 7, which correlates with the moment that high concentrations of eATP are present. In the same study, Wan *et al* demonstrated that blockade of ATP release by carbenoxolone (CBX), or promoting ATP degradation by a potent ATPase (apyrase), reduced eATP levels in the colon and attenuated DSS-induced colitis (26). Conversely, tissue damage in mice with colitis was exacerbated by the inhibition of eATP degradation by sodium metatungstate (POM-1). This supports the implication of eATP in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice, and suggests a role for P2X7. In a different study, the potential therapeutic effect of P2X7 blockade in rat DSS-induced colitis was evaluated using Brilliant Blue G (BBG), a widely used non-peptidic P2X7 antagonist (11). BBG ameliorated colitis induced by DSS, restoring colonic macroscopic and microscopic morphology. This effect was mediated by the inhibition of Myd88, NF- κ B, IL-6, TNF- α and P2X7 expressions. In addition, BBG reduced NLRP3 inflammasome activation, subsequent caspase-1 activation and IL-1 β and IL-18 release. The combined administration of OLT1177, a selective NLRP3 inhibitor, with BBG potentiated its inhibitory effect on NLRP3, caspase-1, IL-1 β and IL-18 levels. Using another model of colitis, other authors reported that intraperitoneal administration of BBG significantly reduced the inflammatory response in the colon of rats treated with TNBS (27). Although these are interesting results suggesting the involvement of P2X7 in the pathogenesis of inflammatory colitis, the specificity of BBG has been questioned, with data proving that it can also antagonize P2X1, P2X2, P2X3, and P2X4 receptors to some extent, as well as voltage-gated sodium channels (28). In addition, compared to our approach, where a single injection of AAV-13A7-Fc was sufficient to obtain high nanobody-based biologics concentration

in the serum and significant therapeutic effects, BBG was administered either on a daily basis (11), or before and three days after colitis induction in prior studies (27). A recent study has also reported the development of novel pyroglutamide-based P2X7 antagonists, with two compounds exhibiting beneficial effects in the DSS-induced colitis model. Although these are all promising results, treatment was administered on a daily basis (29).

In summary, our data demonstrates that nanobody delivery through AAV leads to long-term and stable nanobody-based biologic production in vivo and that i.m. administration of AAV-13A7-Fc led to beneficial effects on DSS-induced colitis, with a reduction of clinical symptoms, colon histopathology as well as a downregulation of the expression of multiple chemokines and proinflammatory cytokines. The P2X7-blocking/potentiating strategy used provide a valuable new tool for assessing the role of P2X7 during a variety of inflammatory as well as other pathophysiological contexts where P2X7 is suspected to play an important role, ranging from cancer, autoimmune disease to neurodegenerative disease to cite a few. In the context of intestinal inflammation, our data validated the beneficial role of P2X7-inhibition and suggested that nanobody-based biologics represent a novel class of pharmacological drugs with high potency and selectivity that may complement the already available therapeutic strategies.

Acknowledgements

The present work was funded by the Institut National du Cancer (INCa) and by Agence National de la Recherche (ANR).

References

1. O. Kepp, F. Loos, P. Liu, G. Kroemer, Extracellular nucleosides and nucleotides as immunomodulators. *Immunol Rev* **280**, 83-92 (2017).
2. B. Rissiek, F. Haag, O. Boyer, F. Koch-Nolte, S. Adriouch, P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* **6**, 204 (2015).
3. M. J. Bours, E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, P. C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* **112**, 358-404 (2006).
4. B. Gu, L. J. Bendall, J. S. Wiley, Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92**, 946-951 (1998).
5. H. Moon, H. Y. Na, K. H. Chong, T. J. Kim, P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett* **102**, 98-105 (2006).
6. S. Hubert *et al.*, Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* **207**, 2561-2568 (2010).
7. P. Pelegri, P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochem Pharmacol* **187**, 114385 (2021).
8. A. Cesaro *et al.*, Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G32-42 (2010).

9. A. Trautmann, Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci Signal* **2**, pe6 (2009).
10. A. R. Neves *et al.*, Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **20**, 444-457 (2014).
11. S. Saber *et al.*, BBG enhances OLT1177-induced NLRP3 inflammasome inactivation by targeting P2X7R/NLRP3 and MyD88/NF-kappaB signaling in DSS-induced colitis in rats. *Life Sci* **270**, 119123 (2021).
12. P. Hofman *et al.*, Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cancer Res* **75**, 835-845 (2015).
13. P. Illes *et al.*, Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br J Pharmacol* **178**, 489-514 (2021).
14. S. Muyldermans, Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* **82**, 775-797 (2013).
15. W. Danquah *et al.*, Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med* **8**, 366ra162 (2016).
16. W. Danquah *et al.*, Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med* **8**, 366ra162 (2016).
17. V. Ghetie *et al.*, Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol* **15**, 637-640 (1997).
18. M. J. Curtis *et al.*, Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol* **175**, 987-993 (2018).
19. M. Demeules *et al.*, Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front Oncol* **10**, 1699 (2020).
20. F. Scheuplein *et al.*, NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* **182**, 2898-2908 (2009).
21. D. D. Eichele, K. K. Kharbanda, Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol* **23**, 6016-6029 (2017).
22. P. Colella, G. Ronzitti, F. Mingozzi, Emerging Issues in AAV-Mediated. *Mol Ther Methods Clin Dev* **8**, 87-104 (2018).
23. A. B. Balazs, J. D. Bloom, C. M. Hong, D. S. Rao, D. Baltimore, Broad protection against influenza infection by vectored immunoprophylaxis in mice. *Nat Biotechnol* **31**, 647-652 (2013).
24. J. M. Brady, D. Baltimore, A. B. Balazs, Antibody gene transfer with adeno-associated viral vectors as a method for HIV prevention. *Immunol Rev* **275**, 324-333 (2017).
25. M. W. Metzger *et al.*, Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. *Purinergic Signal* **13**, 153-170 (2017).
26. P. Wan *et al.*, Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 x 7 receptor signaling. *Sci Rep* **6**, 19108 (2016).
27. C. C. Marques *et al.*, Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 65-78 (2014).
28. S. Jo, B. P. Bean, Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by brilliant blue G. *Mol Pharmacol* **80**, 247-257 (2011).
29. G. Homerin *et al.*, Pyroglutamide-Based P2X7 Receptor Antagonists Targeting Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem* **63**, 2074-2094 (2020).

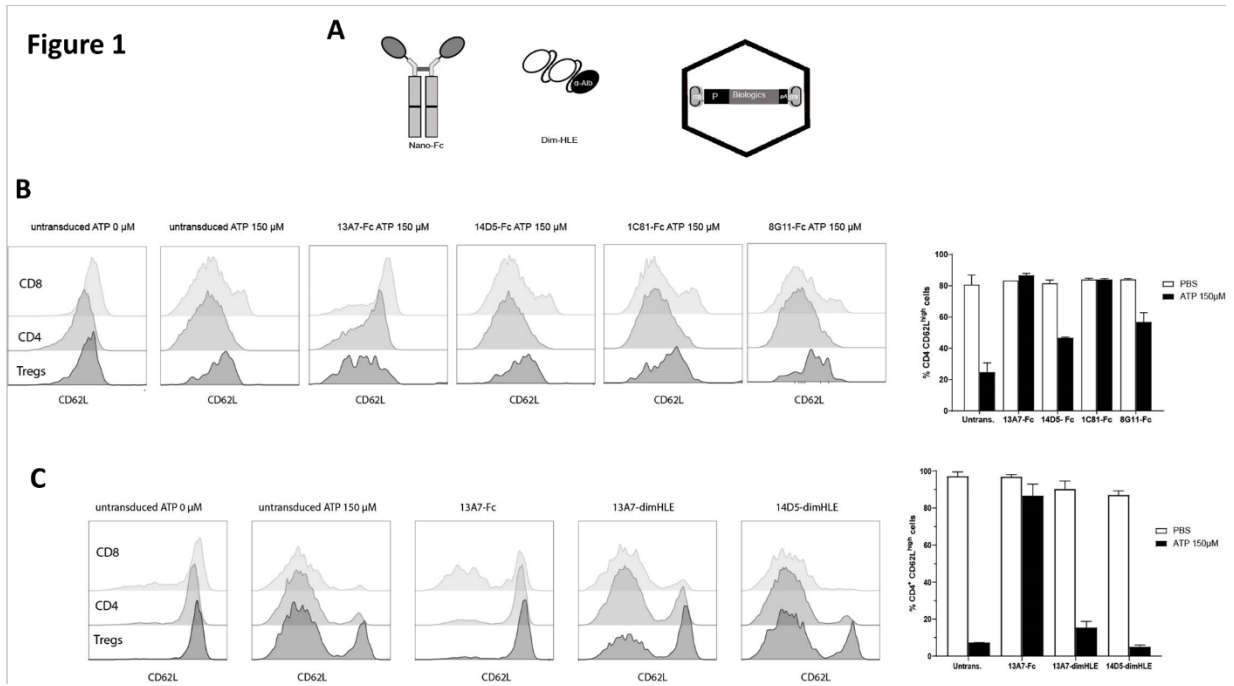


Figure 1. Comparison of the effects of a single intramuscular injection of AAV1 encoding four different nanobodies targeting P2X7. Mice (n=3) were injected with Nb-encoding AAV vectors in the gastrocnemius muscles at day 0. **A.** Schematic diagram of the nanobody constructions used in our studies. Fc nanobodies are coupled to IgG1 with a LSF mutation and dimHLE nanobodies consist on a dimer of nanobodies coupled to an anti-albumin nanobody. These are coded by AAV (AAV). **B.** Percentage of CD4⁺CD62L^{high} cells from blood at day 15 post injection of 1×10^{11} vg per mouse of AAV coding for 4 nanobodies-Fc against P2X7, in the presence or absence of 150 μ M of ATP. **C.** Representative flow cytometry analysis plots of blood CD62L^{high} CD8⁺, CD4⁺ and Treg cells from mice receiving AAV-13A7-Fc, AAV-13A7-dimHLE or AAV-14D5-dimHLE in the presence or absence of 150 μ M of ATP on day 17 post-injection

Figure 2

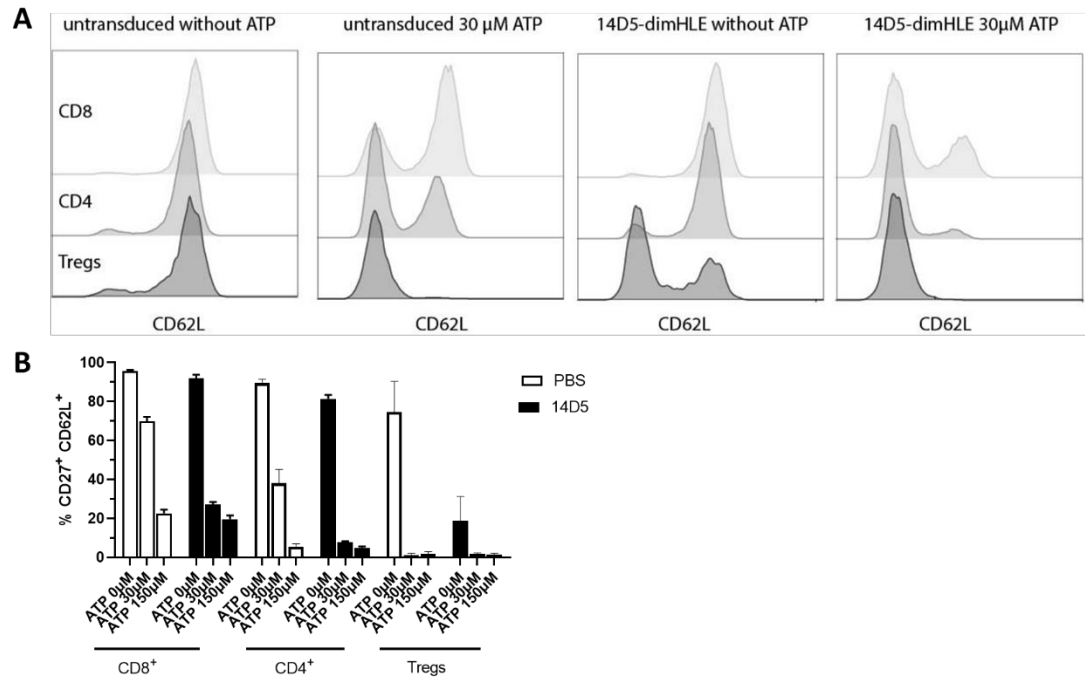


Figure 2. A. Representative flow cytometry analysis plots of blood CD62Lhigh CD8+, CD4+ and Treg cells from mice receiving AAV-14D5-dimHLE or untransduced mice, in the presence or absence of 30 μ M of ATP on day 21 post-injection. B. Percentage of blood CD8+, CD4+ and Tregs CD62L high cells from AAV-14D5-dimHLE and untransduced injected mice (day 21 post-injection) in the presence or absence of 0, 30 μ M, 150 μ M of ATP.

Figure 3

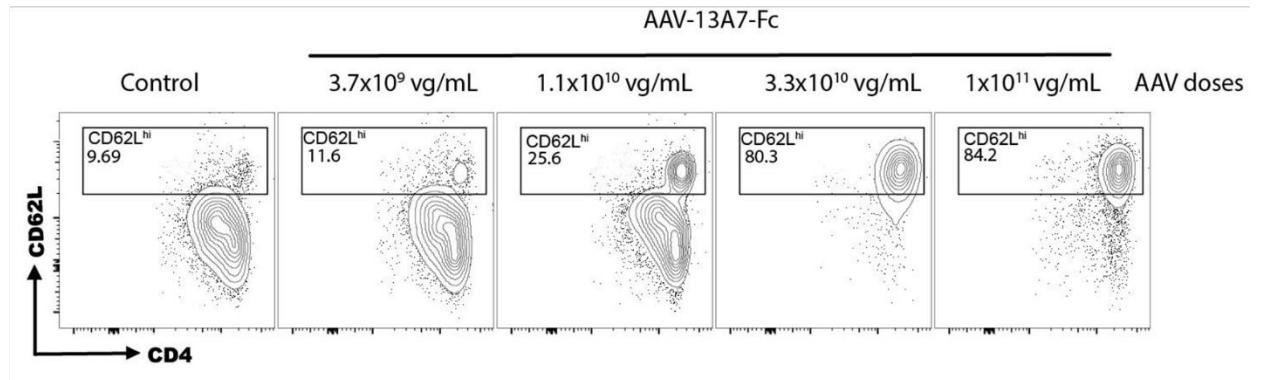


Figure 3. AAV-13A7-Fc Dose response. FACS plots illustrating ATP-induced shedding of CD62L from vascular CD4⁺ T cells harvested on day 15 after injection of titrated doses of AAV coding for the P2X7-blocking Nb 13A7-Fc. Results represent the mean $\pm$ SD.

Figure 4

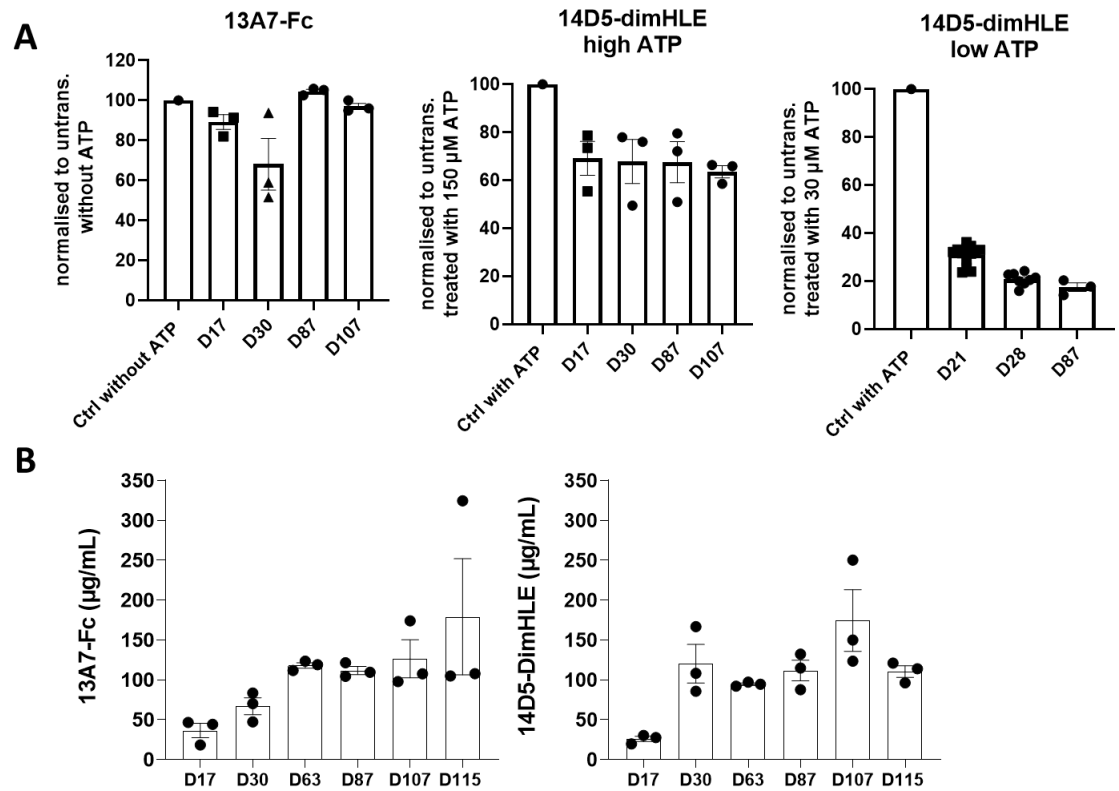


Figure 4. Comparison between two nanobodies half-life extending formats blocking or potentiating P2X7

A. Percentage of blood CD4+ CD62L high cells normalized to untransduced without ATP for 13A7-Fc. Percentage normalized to untransduced with corresponding ATP of blood CD4+ CD62L high cells at high concentration of ATP (150 μ M) or low ATP (30 μ M) for 14D5-dimHLE injected mice. Results represent the mean $\pm$ SD. **B.** 13A7-Fc and 14D5-dimHLE nanobody levels in the sera of AAV-injected mice

Figure 5

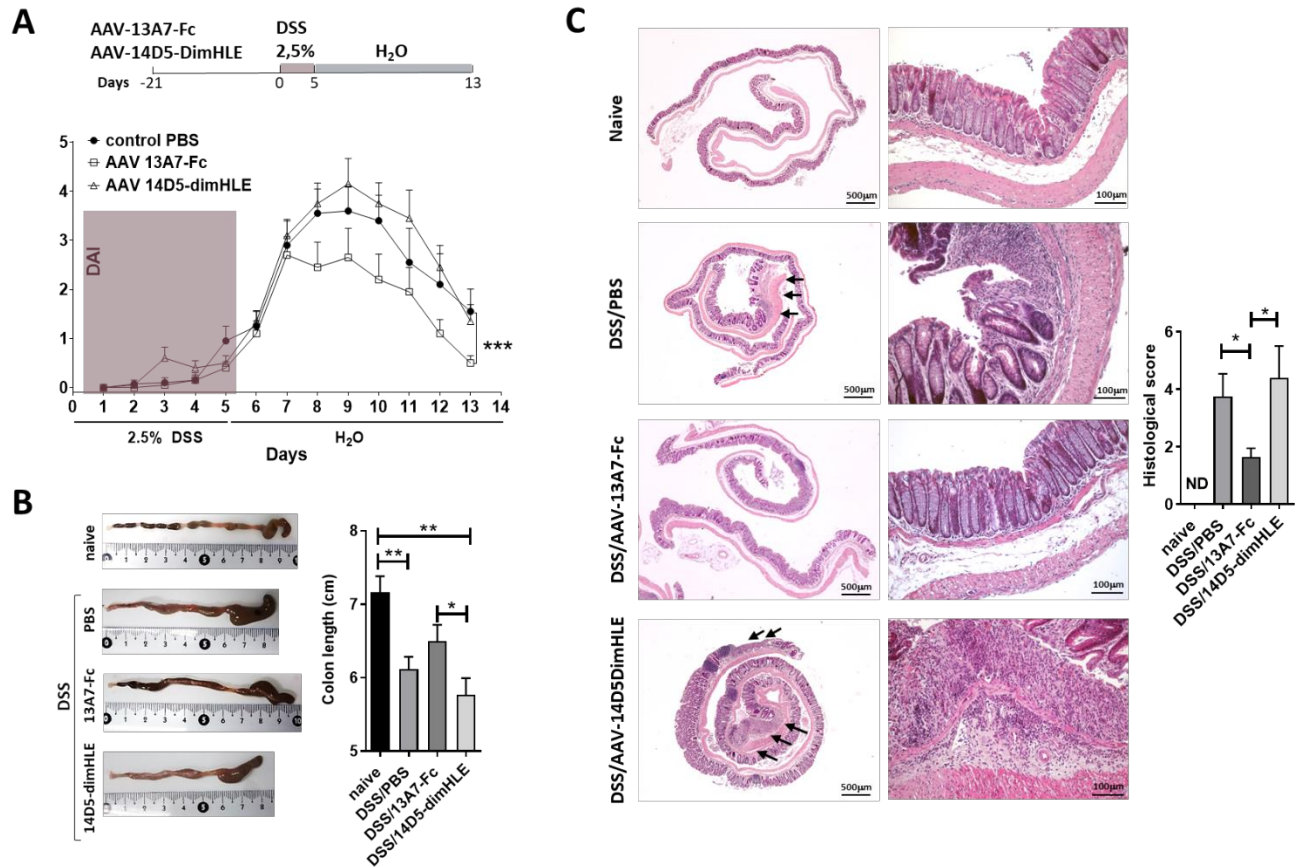


Figure 5. AAV-13A7-Fc administration ameliorated DSS-induced colitis. Mice (n=10) received 1×10^{11} vg of AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and three weeks later they were given 2.5% DSS in the drinking water. Mice were switched to regular water for eight additional days and colons were collected in the end of the study. **A.** Disease activity score (DAI). **B.** Colon macroscopic appearance. **C.** Histopathological analysis of colon stained with hematoxylin and eosin staining. Mean $\pm$ SEM are shown. Statistical comparison Two-way ANOVA (A) or Student's t-test (B and C) was performed with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 6

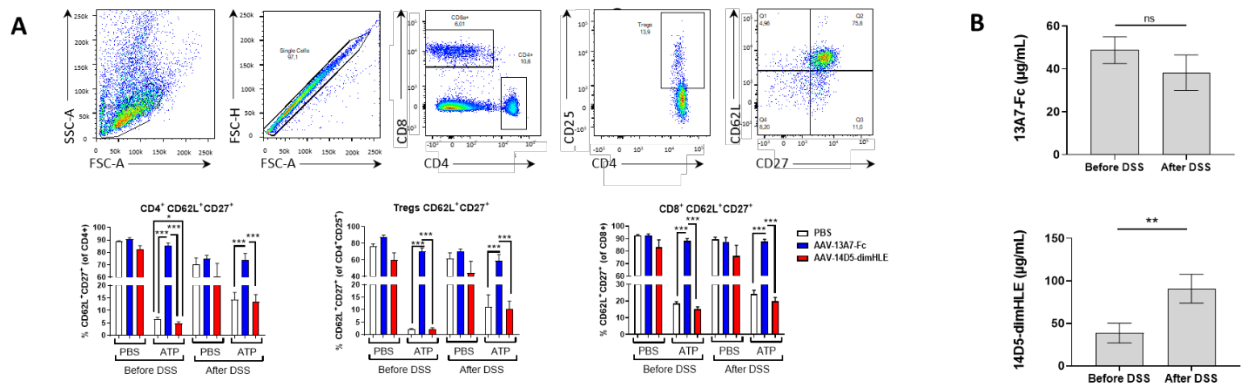


Figure 6. Blocking effect of AAV-13A7-Fc administration on CD62L shedding during DSS administration. **A.** Blood was harvested from AAV-13A7-Fc or AAV-14D5-dimHLE injected mice, and CD62L and CD27 shedding was evaluated in the presence or absence of 150μM of ATP by flow cytometry. **B.** Sera was collected before DSS treatment start (three weeks after AAV injection) and after 2.5% DSS + regular water treatment (day 13). Nb levels were titrated with secondary anti-Nb antibodies using flow cytometry. Statistical analysis was performed by Student's t-test with *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

Figure 7

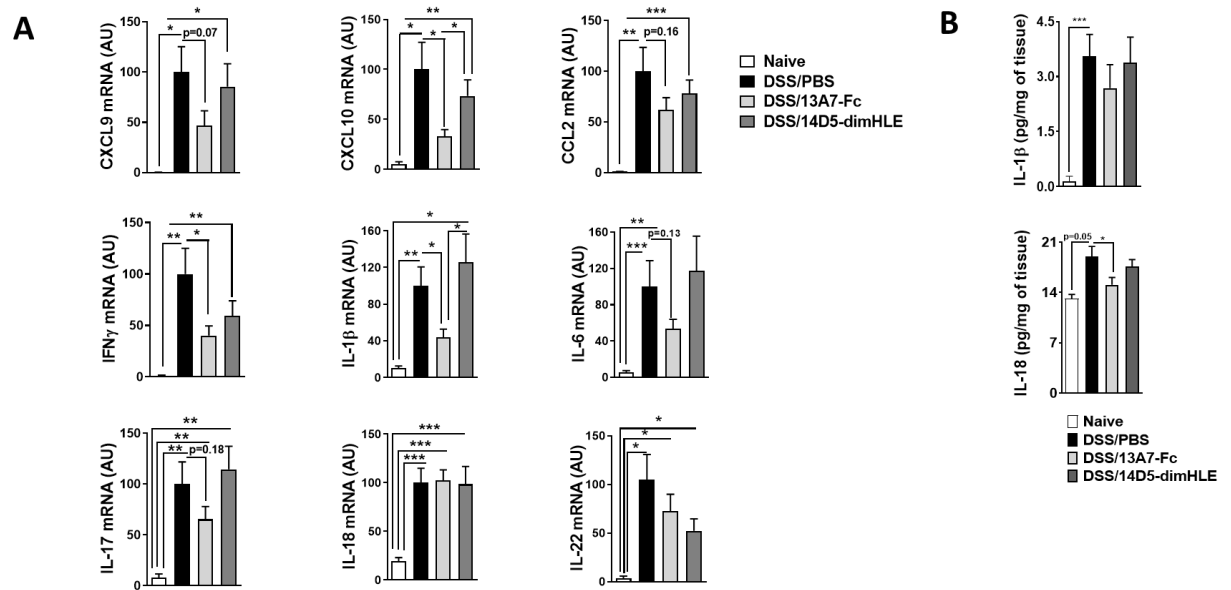


Figure 7. Chemokines and proinflammatory cytokine productions were reduced in mice receiving AAV-13A7-Fc. Mice receiving AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE (1×10^{11} vg) ($n=10$), were given three weeks later 2.5% DSS in the drinking water for five days. Colons were collected on day 13 for chemokine and cytokine assessments. **A.** mRNA expression of multiple chemokines (CXCL9, CXCL10 and CCL2) and cytokines (IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 and IL-22) in the colon of mice injected with AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and exposed to DSS (day 13 from the beginning of DSS treatment). **B.** IL-1 β and IL-18 levels in the supernatants of colon explants after 16 h of culture. Statistical analysis was performed by Student's t-test with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure S1

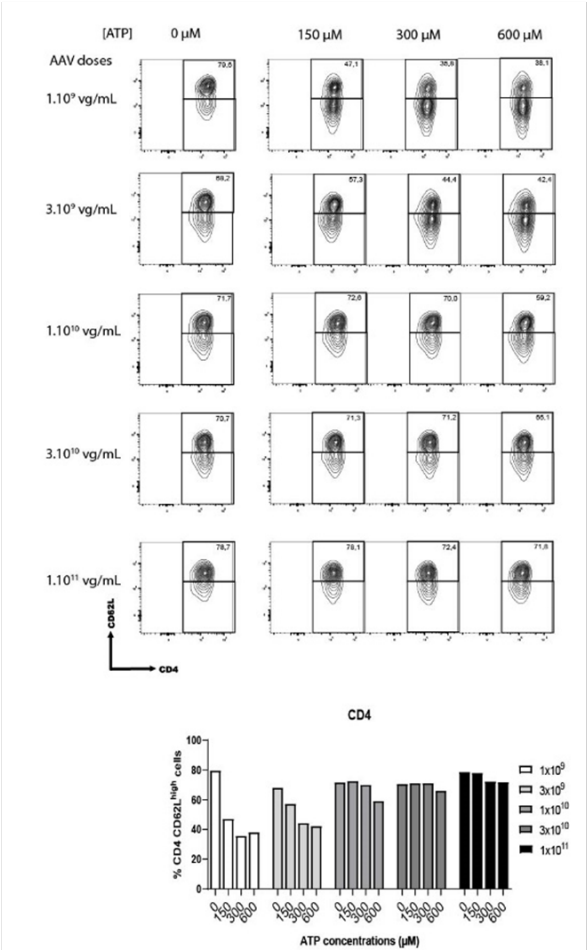


Figure S1. Dose response of 13A7-Fc rAA at long term

FACS plots illustrating ATP-induced shedding of CD62L from vascular CD4+ T cells harvested on day 84 after injection of titrated doses of AAV coding for the P2X7-blocking Nb 13A7-Fc. Results represent the mean ± SD.

Figure S2

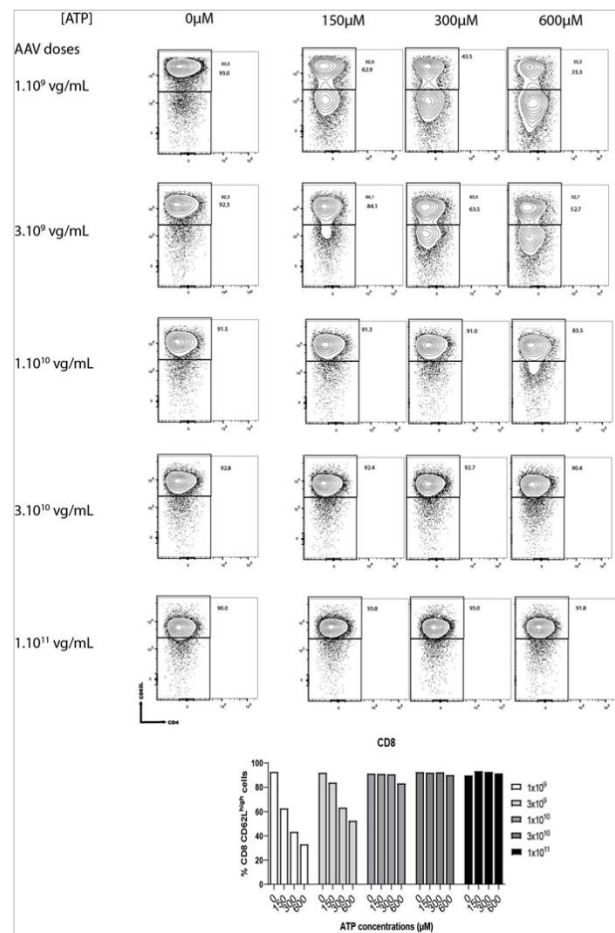


Figure S2. Dose response of 13A7-Fc AAV at long term.

FACS plots illustrating ATP-induced shedding of CD62L from vascular CD8⁺ T cells harvested on day 84 after injection of titrated doses of AAV coding for the P2X7-blocking Nb 13A7-Fc. Results represent the mean ± SD

Figure S3

D120

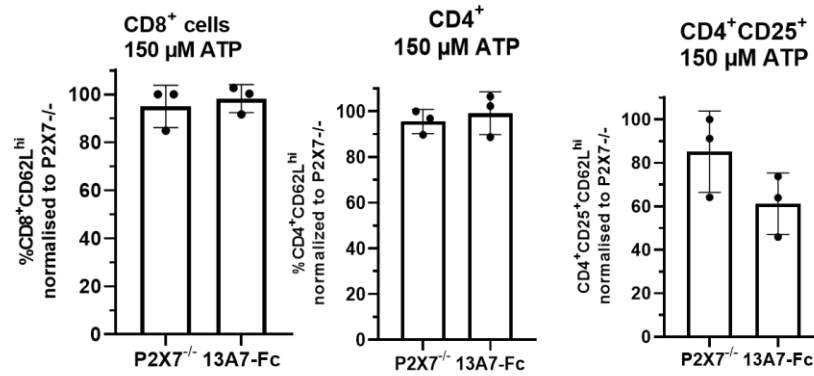


Figure S3. Comparison of 13A7-Fc inhibition to P2X7^{-/-} mice.

splenocytes were treated ex vivo with 150 μ M of ATP and P2X7 function was then evaluated on CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺ CD25⁺ cells and compared with the splenocytes collected from P2X7^{-/-} mice at day 120.

Figure S4

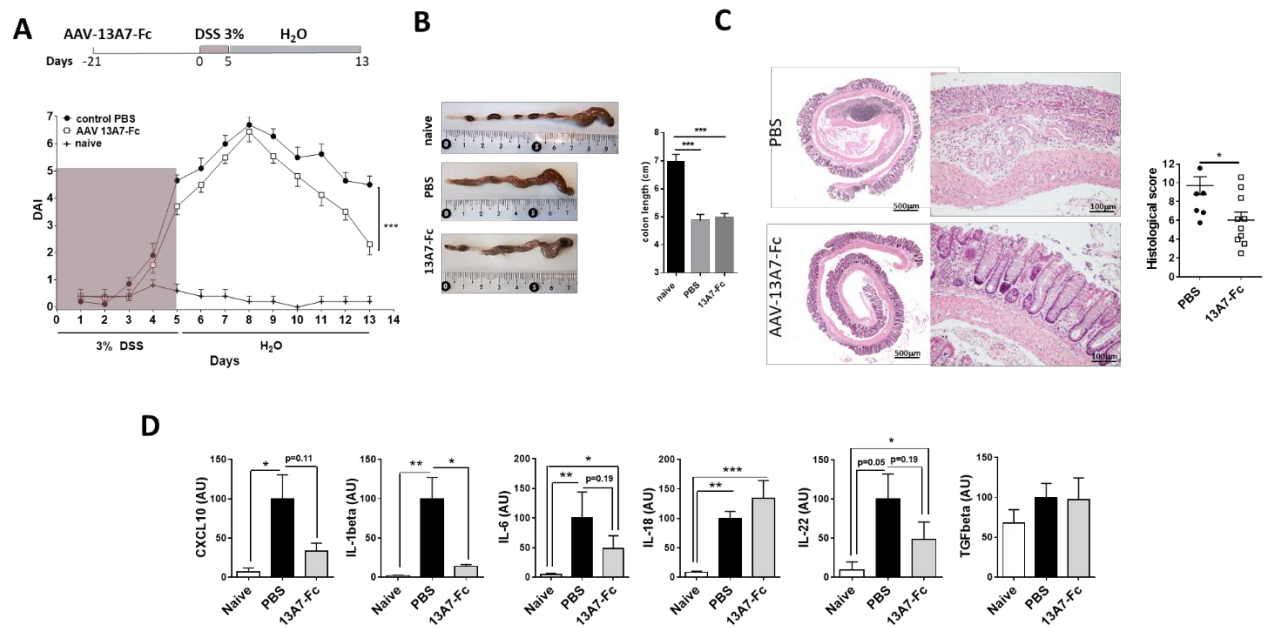


Figure S4. AAV-13A7-Fc administration ameliorated DSS-induced colitis

Mice (n=10) received 1×10^{11} vg of AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and three weeks later they were given 3% DSS in the drinking water. Mice were switched to regular water for eight additional days and colons were collected in the end of the study. **A**. Disease activity score score from 13A7-Fc and untransduced mice with a higher dose of DSS (3%). **B**. Colon macroscopic appearance naïve, untransduced and 13A7-Fc mice. **C**. Histopathological analysis of colon stained with hematoxylin and eosin staining. **D**. mRNA expression of chemokine CXCL10 and cytokines (TGF-β, IL-1β, IL-6, IL-18 and IL-22) in the colon of mice injected with AAV coding for 13A7-Fc and exposed to DSS (day 13 from the beginning of DSS treatment). Mean ± SEM are shown. Statistical comparison Two-way ANOVA (A) or Student's t-test (B and C) was performed with *p<0.05 and **p<0.01.

Article 3, Publication

Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano)

Mélanie Demeules, Allan Scarpitta, Catalina Abad, Henri Gondé, Romain Hardet, Carolina Pinto-Espinoza, Anna Marei Eichhoff, Waldemar Schäfer, Friedrich Haag, Friedrich Koch-Nolte, Sahil Adriouch

Frontiers in oncology, doi : 10.3389/fonc.2020.01699 – PMID : 33042812

Contexte de l'étude. L'adénosine triphosphate (ATP) représente un signal de danger qui s'accumule dans les tissus lésés, dans les sites inflammatoires et dans le microenvironnement tumoral. L'ATP va se lier sur les récepteurs de la membrane plasmique des familles P2Y et P2X. Parmi les récepteurs P2X, P2X7 a suscité un intérêt croissant dans le domaine de l'inflammation et du cancer. L'activité de P2X7 a été associée à la production et à la libération de cytokines pro-inflammatoires, à la modulation de l'activité et de la survie des cellules immunitaires et à la stimulation de la prolifération et des propriétés migratoires des cellules tumorales. Par conséquent, P2X7 joue un rôle complexe dans le microenvironnement tumoral, combinant des effets bénéfiques et néfastes qui doivent être étudiés de manière plus approfondie.

Méthode. Dans le but d'étudier le rôle du récepteur P2X7 dans le contexte tumoral, nous avons utilisé la méthodologie AAV-nano. Nous avons injecté un rAAV codant soit pour des nanobodies 13A7-hcAb antagonistes de P2X7 soit des nanobodies 14D5-dimHLE potentialisateurs de P2X7 en présence d'ATP. Ces animaux ont été injectés 3 semaines après en sous cutané avec des cellules tumorales EG7 exprimant P2X7.

Principaux résultats.

- Les cellules EG7 expriment le récepteur P2X7 et sont sensibles à la mort cellulaire induite par ce récepteur
- Une seule injection du rAAV-nano permet une expression du transgène à long terme et une modulation de P2X7 *ex vivo* mesuré avec le test de la perte de CD27 et CD62L dépendante de P2X7. On est également capable de détecter, dans le plasma des animaux injectés avec les rAAV trois semaines plus tôt, les nanobodies de façon saturante. Ces derniers sont capables de se fixer aux cellules EG7.
- L'inhibition de P2X7 par le rAAV-13A7hcAb permet de diminuer le volume tumoral et de le faire régresser ainsi que d'augmenter la survie des animaux.



Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano)

Mélanie Demeules¹, Allan Scarpitta¹, Catalina Abad¹, Henri Gondé¹, Romain Hardet¹, Carolina Pinto-Espinoza², Anna Marei Eichhoff², Waldemar Schäfer², Friedrich Haag², Friedrich Koch-Nolte² and Sahil Adriouch^{1*}

¹ Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies, Rouen, France, ² Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Lin-Hua Jiang,
University of Leeds, United Kingdom

Reviewed by:

Claudio Coddou,
Catholic University of the North,
Coquimbo, Chile
Ben J. Gu,
Florey Institute of Neuroscience
and Mental Health, University
of Melbourne, Australia

*Correspondence:

Sahil Adriouch
sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacology of Anti-Cancer Drugs,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 12 January 2020

Accepted: 30 July 2020

Published: 11 September 2020

Citation:

Demeules M, Scarpitta A,
Abad C, Gondé H, Hardet R,
Pinto-Espinoza C, Eichhoff AM,
Schäfer W, Haag F, Koch-Nolte F and
Adriouch S (2020) Evaluation of P2X7
Receptor Function in Tumor Contexts
Using rAAV Vector and Nanobodies
(AAVnano). *Front. Oncol.* 10:1699.
doi: 10.3389/fonc.2020.01699

Adenosine triphosphate (ATP) represents a danger signal that accumulates in injured tissues, in inflammatory sites, and in the tumor microenvironment. Extracellular ATP is known to signal through plasma membrane receptors of the P2Y and P2X families. Among the P2X receptors, P2X7 has attracted increasing interest in the field of inflammation as well as in cancer. P2X7 is expressed by immune cells and by most malignant tumor cells where it plays a crucial yet complex role that remains to be clarified. P2X7 activity has been associated with production and release of pro-inflammatory cytokines, modulation of the activity and survival of immune cells, and the stimulation of proliferation and migratory properties of tumor cells. Hence, P2X7 plays an intricate role in the tumor microenvironment combining beneficial and detrimental effects that need to be further investigated. For this, we developed a novel methodology termed AAVnano based on the use of Adeno-associated viral vectors (AAV) encoding nanobodies targeting P2X7. We discuss here the advantages of this tool to study the different functions of P2X7 in cancer and other pathophysiological contexts.

Keywords: P2X7, tumor, Adeno-associated virus, Nanobodies (VHH), animal models

INTRODUCTION

Adenosine triphosphate (ATP) released into the extracellular space represents a well-known danger signal that can signal through two main families of plasma membrane receptors: G protein-coupled receptors, named P2Y receptors, and ATP-gated ion channels termed P2X receptors (1). Among the latter family, P2X7 (also known as P2RX7) forms a homotrimeric receptor that has attracted much interest in the fields of inflammation and cancer. Activation of P2X7 by relatively high concentrations of extracellular ATP leads to Na⁺ and Ca²⁺ influx, and K⁺ efflux. This triggers not only major changes in the cellular ionic content, but also signaling and metabolic pathways involved in cell activation, survival and fate. Prolonged activation of P2X7 leads to the opening of a membrane pore allowing the entry of large molecules of up to 900 Da (2). Whether this membrane permeabilization is due to dilation of the P2X7 channel itself, or the activation of non-selective pores like pannexin-1, gasdermin-D, or anoctamin-6, may depend on the cellular

context, the lipid composition of the membrane, and on the level of expression of these proteins (2–4). Whatever the precise molecular mechanism leading to pore formation, P2X7 activation can lead to major perturbation of intracellular ion balance and to modification of cellular activities, cellular functions, and cell fate.

High concentrations of extracellular ATP, released in the vicinity of stressed or damaged cells, during inflammation, but also within the tumor site, represent a prototypic “danger signal” that can influence the activity and function of immune cells (5–8). P2X7 is expressed at the cell surface of various leukocytes, in particular monocytes, macrophages, T cells and notably regulatory T cells (Tregs), and is found also at the surface of numerous tumor cell types. Extracellular ATP plays a complex role within the tumor microenvironment depending on multiple factors such as its concentration, the abundance of ecto-ATPases, the expression level of P2X7, and the nature of the P2X7 variant expressed by immune and tumor cells (9).

The functions of P2X7 in immune cells are largely documented. Gating P2X7 on macrophage, microglia, and dendritic cells triggers the formation of the inflammasome, a multiprotein complex that drives caspase-mediated maturation and release of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 (10). On T lymphocytes, P2X7 induces the shedding of CD62L and CD27 by metalloproteases (11, 12) and controls the differentiation, proliferation and survival of tissue resident memory T cells (13, 14). Regulatory T cells are known to express P2X7 at high levels, and its activation induces shedding of CD62L and CD27, phosphatidylserine exposure, pore formation, and finally leads to cell death (11, 15). Taken together, activation of P2X7 on myeloid and lymphoid cells converge to promote and amplify inflammation (16, 17). Animals deficient for P2X7 show reduced inflammation in several animal models including experimental colitis (18), collagen-induced arthritis (19), and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (20). P2X7 receptor antagonists have been developed by several pharmaceutical companies as potential novel anti-inflammatory drugs (21).

ROLE OF P2X7 ON TUMOR GROWTH AND ON ANTI-TUMOR IMMUNE RESPONSES

P2X7 functions in cancer are complex and depend on the composition of the tumor microenvironment and the nature of the cells that express this ion channel. P2X7 is associated with a pro-inflammatory activity which could be beneficial for tumor growth and maintenance. However, P2X7 activation is also linked to immunogenic cell death and has been associated with inflammasome formation and dendritic cell activation, which in turn promote adaptive anti-tumor immune responses (22). As mentioned earlier, P2X7 promotes Treg depletion, which increases antitumor immune responses by unleashing effector functions of T cells (6, 15). In line with the anti-tumor activity of P2X7, tumor cell lines appear to grow faster when transferred to P2X7^{-/-} mice (23), and genetic and pharmacological inactivation of P2X7 increases tumorigenesis

in the colitis-associated cancer model (18). However, P2X7 is also expressed by most tumor cells, where it is associated with cancer progression. Indeed, tumor cells express P2X7 at low levels and/or express P2X7 variants that are inefficient to promote cell death but which instead exert a trophic activity. In such situations, tonic stimulation of P2X7 by extracellular ATP already present in the tumor microenvironment can stimulate cell metabolism, influences the Ca²⁺ content of mitochondria and endoplasmic reticulum, increases the intracellular ATP content, protects against apoptosis, and promote tumor growth (24–27). Accordingly, stable transfection of the colon carcinoma tumor model CT26 with a P2X7 expression vector accelerated tumor growth *in vivo* (28), and P2X7 blockade using oxidized ATP (oATP), a poorly selective but irreversible antagonist, reduced melanoma B16 tumor growth *in vivo* (29). Taken together, on the side of the tumor, P2X7 promotes cell survival, tumorigenic potential and proliferation, but on the side of immune cells, P2X7 favors dendritic cell activation, presentation of tumor antigens, and initiation of an adaptive immune response. It appears therefore that the net effect of P2X7 is difficult to predict and that the balance could be tilted toward a pro- or anti-tumorigenic outcome, depending on the composition of the tumor microenvironment, on the level of P2X7 expression, and on the nature and functionality of the P2X7 variants expressed by tumor cells.

METHODS TO STUDY THE ROLE OF P2X7 *IN VIVO*

To investigate the role of P2X7 *in vivo*, several tools have been developed including genetically deficient animals, pharmacological inhibitors, and specific antibodies. P2X7^{-/-} mice have been widely used to study P2X7 function *in vivo* since the generation of the first two P2X7 KO strains by Pfizer and Glaxo (30, 31). However, it subsequently became apparent that both lines are leaky: the Glaxo line, in which exon 1 was targeted, still expresses the P2X7k variant on T cells (32, 33) while the Pfizer line, in which exon 13 was targeted, still expresses a C-terminal truncated variant displaying lower functionality (34). This situation could explain reported phenotypic and functional differences as well as conflicting results in disease models using these two P2X7 deficient lines (20, 35, 36). However, novel knockout models and P2X7-floxed mutants derived from the European Mutant Mouse Archive (EMMA) are now available and may facilitate the reevaluation of P2X7 functions *in vivo* in different disease models (37, 38).

Pharmacological inhibitors of P2X7 like brilliant blue G (BBG) and oATP have shown therapeutic benefit in several animal models including EAE, experimental colitis, inflammatory pain in arthritic animals, or/and antibody-mediated nephritis (36, 39–42). Blocking P2X7 by these small molecule inhibitors has also been shown to inhibit tumor growth in several tumor models that express P2X7 (28, 29). BBG and oATP are rather inexpensive but lack specificity and are associated with off-target side effects. The development of more specific antagonists by several pharmaceutical companies has facilitated the evaluation

and confirmation of the role of P2X7 in these diseases (23, 28, 36, 39). However, these antagonists are sometimes more difficult to obtain and are expensive to use, notably in chronic models where they have to be injected every other days for several weeks.

P2X7 MODULATING NANOBODIES

Antibodies represent another emerging class of potent pharmaceutical modulators that are used to block or to potentiate their targets *in vivo*. Conventional antibodies are composed of two heavy and two light chains that contribute together to the antigen-binding site. Conventional antibodies represent relatively large molecules of ~150 kDa. In direct relation with their size, their biodistribution into tissues is limited (43). In comparison, smaller proteins derived from antibodies but containing only the binding domains fused directly via a linker (i.e., single-chain variable fragment or scFv) offer better biodistribution coefficients. More recently developed nanobodies offer an interesting alternative. Nanobodies are derived from unconventional antibodies found in llamas and other camelids that are composed only of heavy chains. Nanobodies and heavy chain antibodies present similar specificities and affinities as classical antibodies but exhibit a smaller size (80 kDa, 15 kDa) and a better tissue penetration notably into tumors (44–46).

A set of nanobodies modulating P2X7 was selected by phage display from llamas immunized with cDNA expression vectors or P2X7-transfected HEK cells encoding for mouse and human P2X7 (47). In this study, two nanobodies were selected and used to modulate the function of mouse P2X7. Interestingly, one of them potently blocks P2X7 while the other potentiates its activities. These nanobodies, termed 13A7 and 14D5, respectively, were used *in vivo* to validate the function of P2X7 in disease models. Systemic administration of 13A7 reduced inflammation in mouse models of allergic dermatitis and of glomerulonephritis. Conversely, 14D5 administrated *in vivo* aggravated disease scores in both animal models (47). Repeated administration of these selected anti-P2X7 nanobodies *in vivo* undoubtedly represents a novel means to study P2X7 functions in different pathophysiological situations.

AAV-NANOBODIES (AAVnano) METHODOLOGY

We present and illustrate here the development of a novel methodology using adeno-associated viral vectors (AAV) encoding anti-P2X7 nanobodies for studying P2X7 function *in vivo*, notably in chronic situations. AAV vectors have widely been used for gene transfer *in vivo* to elicit long-term expression of the transgenic protein of interest. For instance, a single intramuscular injection of AAV encoding HIV-neutralizing antibodies resulted in their long-lasting systemic production in mice (48) and non-human primates (49). We implemented a similar AAV-mediated gene transfer method to produce *in situ* anti-P2X7 nanobodies with the aim to durably modulate

P2X7 function *in vivo*. For that, we generated AAV vectors encoding a bivalent P2X7-antagonistic heavy chain antibody designated 13A7-hcAb (nanobody 13A7 fused to the hinge and Fc-domains of mouse IgG1) or a bivalent, half-life extended P2X7-potentiating nanobody dimer designated 14D5-dimHLE (dimer of nanobody 14D5 fused to the albumin-specific nanobody Alb8 conferring half-life extension) (47). The methodology that we developed, termed AAVnano, requires only a single intramuscular (i.m.) injection of the corresponding AAV vector to elicit long-term systemic expression of these nanobody constructs *in vivo* for at least 120 days (unpublished observations). This avoids the daily injection of nanobodies necessary to maximize the modulation of P2X7 functions and offers the possibility to inhibit or to potentiate P2X7 in chronic models such as chronic inflammation, autoimmune diseases, carcinogenesis, or tumor growth (Figure 1).

ILLUSTRATION OF THE AAVnano METHODOLOGY IN A TUMOR MODEL

As discussed earlier, P2X7 plays complex and partially opposing roles in tumor growth and anti-tumor immune responses. To evaluate the potential utility of the AAVnano methodology, we chose to study the *in vivo* growth of the C57BL/6 mouse lymphoma cell line EG7 that naturally expresses significant surface levels of P2X7 (Figure 2A). We found that EG7 naturally expresses P2X7 at a level that is similar to the level detected at the surface of A20-P2X7 cells obtained after stable transfection of the BALB/c mouse B cell lymphoma A20 with an expression plasmid encoding full-length mouse P2X7 (50). To further characterize the functionality of P2X7 on EG7 cells, we verified their sensitivity to cell death induced by high concentrations of ATP (Figure 2B). As expected, addition of the recombinant nanobodies 13A7-hcAb or 14D5-dimHLE, respectively, inhibited and potentiated ATP induced-cell death, confirming the involvement and the functionality of P2X7 (Figure 2C).

Next, we aimed to study the situation *in vivo* in a context where P2X7 would be permanently and durably blocked or potentiated by 13A7-hcAb or 14D5-dimHLE nanobodies produced *in situ*. For that, AAV1 vectors encoding these constructs were injected intramuscularly (i.m.) into syngeneic naive C57BL/6 mice 3 weeks before inoculation of tumor cells. Before tumor inoculation, we obtained blood samples from the AAV injected mice. In order to evaluate the functional effects of nanobodies bound to circulating T cells *in vivo*, we incubated blood leukocytes obtained from these mice with ATP *ex vivo* and analyzed their sensitivity to ATP-induced shedding of CD27 and CD62L, a sensitive P2X7-dependent effect (15). As expected, CD4⁺ T lymphocytes from mice injected with AAV1 encoding P2X7-antagonistic 13A7-hcAb were resistant to ATP-induced CD27 and CD62L shedding while cells from the mice injected with AAV1 encoding the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE showed enhanced sensitivity to ATP-induced shedding of CD27 and CD62L (Figure 2D). Further, indirect flow cytometry analyses *ex vivo* of EG7 and A20-P2X7 cells with

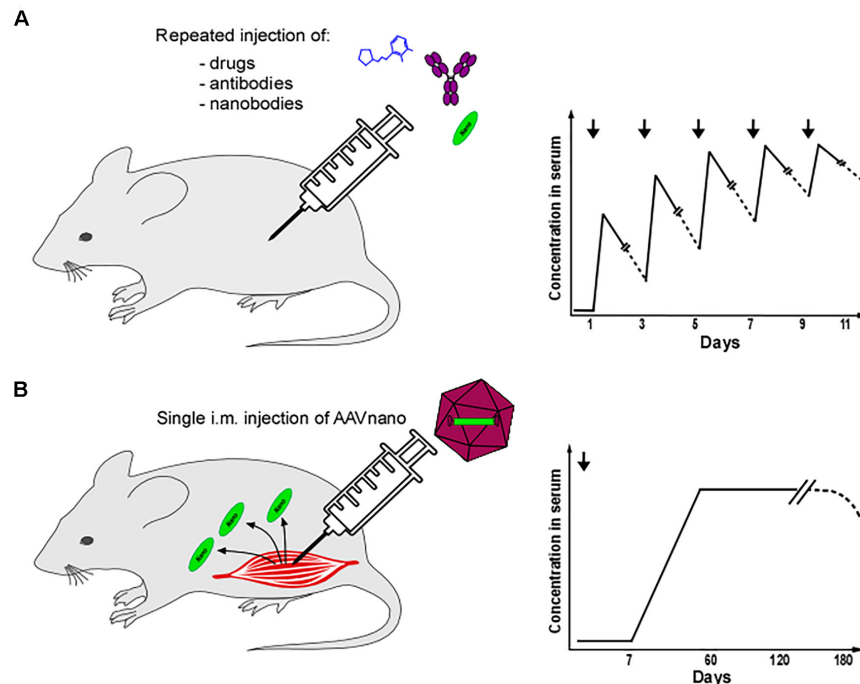


FIGURE 1 | Comparison between repeated injection of drugs or antibodies/nanobodies and AAVnano methodology. Theoretical kinetics of the pharmacological agents in serum using different methodologies. **(A)** Small molecules (blue), antibodies (purple), or nanobodies (green) are generally injected using the i.p. or i.v. routes and necessitate repeated injections usually performed every 1–2 days. **(B)** Using the AAVnano methodology, a single injection of an AAV vector coding for the nanobody of interest is performed at day 0 using the i.m. route. The nanobody is then directly produced *in vivo* by the transduced muscle fibers. The nanobody is detectable in the serum 7–14 days post AAV injection and its concentration slowly increases until reaching a plateau 30–60 days post AAV injection. The nanobody produced *in vivo* can still be present in the serum 120 days post AAV injection.

plasma from these animals confirmed the presence of circulating nanobodies 3 weeks after AAV injection (**Figure 2E**).

Next, the EG7 tumor cells were injected subcutaneously, and tumor growth was monitored for 50 days. The results show that constant production of the P2X7 antagonistic 13A7-hcAb significantly limited EG7 tumor growth *in vivo* (**Figure 2F**). This treatment induced a complete tumor regression in 2 out of 5 mice and significantly improved the survival of treated mice (**Figure 2G**). These data are in line with previous studies showing that expression of P2X7 by tumor cells represents a trophic and pro-survival factor and that P2X7-blockade can inhibit tumor growth *in vivo* (24, 25, 28, 29). In contrast, potentiation of P2X7 function using AAV-mediated *in situ* expression of 14D5-dimHLE did not significantly influence tumor growth in this model (**Figures 2E,G**). One might have expected the opposite effect than 13A7-hcAb, e.g., promotion of tumor growth. On the other hand, P2X7 potentiation could also promote anti-tumor immune responses by mediating death of regulatory T cells (Tregs) by enhancing their sensitivity to NAD-mediated cell death (NICD). We indeed previously demonstrated that P2X7-dependent NICD of Tregs promotes an anti-tumor immune response in the same tumor model (15). The lack of an effect of 14D5-DimHLE on tumor growth could thus reflect balanced anti-tumoral/pro-tumoral effects in the tumor microenvironment. It will be interesting to determine whether potentiation of

P2X7 can enhance anti-tumor immune response when combined with other treatments, e.g., anti-immune checkpoints therapy, immunogenic chemotherapies that increase the release of ATP, or antagonism of CD39/CD73-catalyzed hydrolysis of ATP to immunosuppressive adenosine (51, 52).

Overall, our data support the notion that the AAVnano methodology represents an additional strategy to study the function of P2X7 *in vivo*, allowing target validation in pathophysiological situations where P2X7 has been implicated, including cancer.

DISCUSSION AND PERSPECTIVES OFFERED BY THE AAVnano METHODOLOGY TO STUDY THE IMPORTANCE OF P2X7 IN DIFFERENT PATHOPHYSIOLOGICAL SITUATIONS

The AAVnano methodology presents several theoretical and practical advantages over other methodologies. As compared to chemical compounds, the nanobodies offer better target specificity. Indeed, nanobodies and antibodies in general are known for their excellent ability to discriminate between closely related targets belonging to the same protein family. This may prevent unwanted off-target effects. In the present study, the

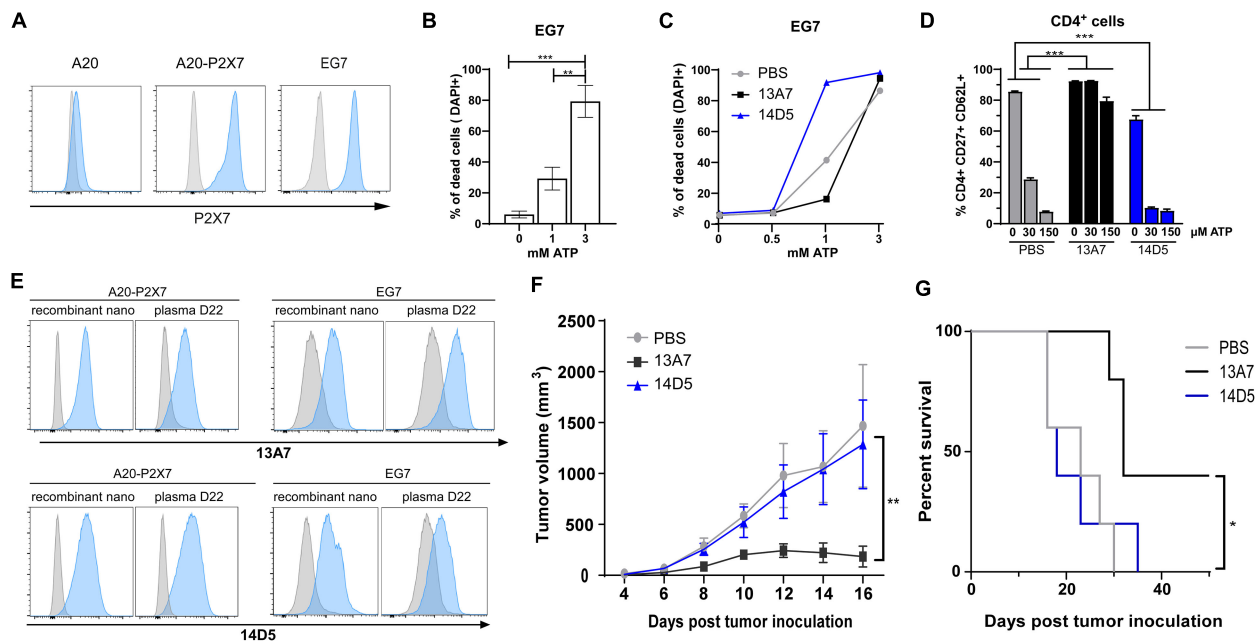


FIGURE 2 | Using the AAVnano methodology to study the role of P2X7 in the EG7 tumor model. **(A)** C57BL/6 mouse EG7 T lymphoma cells expresses P2X7 at the cell membrane. EG7 T lymphoma cells, A20 B lymphoma cells and A20 cells stably transfected with P2X7 were incubated with fluorochrome conjugated P2X7-specific mAb Hano43 (blue) or an isotype control (gray). Bound antibodies were detected by flow cytometry. Similar results were obtained using the P2X7 specific polyclonal antibodies K1G (58). **(B)** EG7 cells are sensitive to ATP-induced cell death *in vitro*. EG7 cells were incubated overnight in culture medium with the indicated concentrations of ATP. Cell death was assessed by flow cytometry after staining with DAPI. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA ($n = 3$, $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$). **(C)** P2X7-specific nanobodies modulate ATP-induced death of EG7 cells. EG7 cells were preincubated for 1 h in the absence (PBS, gray) or presence of 1 μ g/ml 13A7-hcAb (13A7, black) or 14D5-dimHLE (14D5, blue). Cells were then incubated overnight with 0, 0.5, 1, or 3 mM of ATP in culture medium and assayed for cell death using flow cytometry as in **(B)**. **(D)** Nanobodies produced *in situ* modulate P2X7-dependent shedding of CD62L and CD27 by CD4⁺ T cells. 8 weeks old C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (gray) or with AAV1 vector encoding either P2X7-antagonistic 13A7-hcAb (black) or P2X7-potentiating 14D5-dimHLE (blue). 3 weeks later (day 22), blood samples were collected and incubated for 20 min in PBS with the indicated concentration of ATP (0, 30, or 150 μ M ATP). Cells were then stained with fluorochrome-conjugated antibodies against CD4, CD27, CD62L, before fixation and erythrocyte lysis. The percentages of CD4⁺ cells that co-express CD27 and CD62L were then evaluated by flow cytometry. The statistical analysis were performed using two-way ANOVA ($n = 5$, $^{***}p < 0.001$). Similar results were obtained in 3 independent experiments. **(E)** Plasma from AAV-injected mice contain circulating P2X7-specific nanobodies. A20-P2X7 and EG7 cells were incubated either with recombinant nanobodies (1 μ g/ml) or with 10 μ l of pooled plasma obtained at day 22 after AAV injection. Bound nanobodies were detected by fluorochrome-conjugated secondary antibodies using flow cytometry. Histograms in gray correspond to the background staining obtained when using the sera from PBS injected animals. **(F,G)** P2X7 antagonist but not P2X7-agonist constructs inhibit EG7 lymphoma tumor growth *in vivo*. C57BL/6 mice were injected i.m. with 10^{11} AAV1 vectors encoding the P2X7-antagonistic 13A7-hcAb (13A7, black line), or the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE (14D5, blue line). 23 days later, after having confirmed the production and the functionality of these constructs produced *in vivo* (see above **D,E**), 10^6 EG7 lymphoma cells were inoculated subcutaneously in the left flanks. Tumors were monitored every other day during 50 days with a digital caliper, and the tumor volumes were estimated using the formula length $\times$ width $\times$ [(length + width)/2]. **(F)** Tumor volumes in each experimental group are shown for the first 16 days. The statistical analysis was performed using two-way ANOVA ($n = 5$, $^{**}p < 0.01$). **(G)** Mouse survival is illustrated during the entire observation period. The statistical analysis was performed using Log-Rank tests ($n = 5$, $^{*}p < 0.05$). Similar results were obtained in 3 independent experiments.

selected nanobodies bind specifically to mouse P2X7 and do not recognize the closest paralogs P2X4 and P2X1 (47). However, high specificity and lack of cross-reactivity with the P2X7 ortholog of other species may limit the use of a nanobody across species in translational studies. A similar limitation has also been observed with chemical compounds that sometimes display different modulating effects and pharmacological proprieties in humans and other animals.

Adeno-associated viral vectors are widely used in gene therapy settings and represent an efficient and safe approach to transfer a gene of interest into muscle cells and to elicit long-term systemic *in situ* production of a transgenic protein (48, 53). In our experiences, a single intramuscular administration of AAV (10^{11} viral genomes per mouse) coding

for our engineered nanobody constructs was sufficient to elicit effective systemic levels of the blocking or the potentiating P2X7-specific nanobodies. The AAVnano methodology thus avoids daily administration of the corresponding recombinant nanobodies. Arguably, this may additionally provide more favorable pharmacokinetics by maintaining a stable saturating concentration of the desired nanobody *in vivo* and by avoiding peak/decline cycles obtained after repeated injection of a recombinant antibody (Figure 1). This may favor a better bioavailability and tissue penetration, which needs to be confirmed experimentally in future studies. AAVnano may provide a nanobody delivery methodology similar to the one obtained with osmotic pump drug delivery systems, which allow a stable equilibrium of the pharmacological agent

in vivo at a plateau phase (Figure 1). However, as systemic production of transgenic protein *in situ* using AAV vectors is known to follow slow kinetics, with the apparition of the protein of interest 1 to 2 weeks post-transduction, the equilibrium phase is probably not obtained *in vivo* before 2 to 3 weeks (54–56). Hence, the AAVnano methodology is intended to be used in prophylactic models, as in the present study, rather than in a therapeutic setting. However, the kinetics of transgenic protein production can be considerably accelerated using recently developed self-complementary AAV (scAAV) vectors that would be more compatible with therapeutic/interventional protocols (56).

One of the features associated with the AAVnano methodology is the permanent and long-term modulation of P2X7 *in vivo* without any possibility to halt the treatment. While this is adapted to the evaluation of P2X7 functions in chronic diseases, this may appear as an inconvenient in other situations. Additionally, long-term P2X7 modulation (i.e., activation or potentiation) may have unexpected effects on the general physiology of the mice by causing, for instance, immune dysregulation, alteration of barrier functions, or alteration of the microbiota. Knockout mice may possibly not be affected to the same extent by P2X7 deficiency as compensatory mechanisms are presumably induced during embryogenesis, as often observed in knockout animals. In this regard, AAVnano methodology may reveal so far unexpected physiological functions of P2X7 that may be interesting to further explore. One way to avoid such long-term effects would be to use inducible promoters, instead of the ubiquitous CBA promoter used in this study. Such an inducible system, combined with AAV-mediated gene transfer, would allow controlled and timely delivery of the selected nanobody to modulate P2X7 only when required. This type of inducible delivery would be compatible with both, a prophylactic scheme as well as therapeutic/interventional protocols.

Beyond the cancer field, the AAVnano methodology may be further exploited in target-validation studies and in other disease models where P2X7 has been incriminated. Examples are inflammatory models such as acute and chronic experimental colitis, or autoimmune diseases like rheumatoid arthritis, lupus, or experimental allergic encephalitis. Interestingly, besides skeletal muscles, AAV vectors can be used to transduce efficiently a variety of other tissues including heart, liver, kidney, retina, and the central nervous system (CNS). For example, it is conceivable to use stereotaxic injection of AAV9 vectors into the brain to induce expression of the modulating P2X7-specific nanobodies in the CNS. Since P2X7 is expressed in the CNS, particularly by microglial cells and astrocytes, AAVnano may help to

elucidate the role of P2X7 in the pathophysiology of neurological disorders like epilepsy, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, age-related macular degeneration, or cerebral artery occlusion (57). Apart from using tissue-specific conditional P2X7 knockout models, the role of P2X7 in these diseases remains difficult to evaluate as the use of antibodies is limited by the blood-brain barrier. AAVnano may offer a possibility to circumvent this difficulty by exploiting the efficiency of AAV vectors to transduce different regions of the CNS, combined with the good tissue penetration and bioavailability offered by nanobodies. Hence, the AAVnano methodology may pave the way to a better understanding of the role of P2X7 not only in the tumor context, but also in chronic inflammatory/autoimmune diseases and neurological disorders. This may further help the community to evaluate the importance of P2X7 in pathophysiology and as a therapeutic target.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité d'Ethique NORMandie en Matière d'EXpérimentation Animale (CENOMEXA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD, FH, FK-N, and SA conceptualization. MD, AS, CA, and SA methodology. MD, CA, and SA investigation. MD, FK-N, and SA writing – original draft. MD, AS, CA, HG, RH, CP-E, AE, WS, FH, FK-N, and SA writing – review and editing. FK-N and SA funding acquisition. FH, FK-N, and SA Resources. CA, FK-N, and SA supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to FK-N (310/13-1) and by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) to SA (ANR-18-CE92-0046).

REFERENCES

1. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* (2009) 147:S172–81. doi: 10.1038/sj.bjp.0706429
2. Di Virgilio F, Schmalzing G, Markwardt F. The elusive P2X7 macropore. *Trends Cell Biol.* (2018) 28:392–404. doi: 10.1016/j.tcb.2018.01.005
3. Di Virgilio F, Giuliani AL, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Sarti AC. Non-nucleotide agonists triggering P2X7 receptor activation and pore formation. *Front Pharmacol.* (2018) 9:39. doi: 10.3389/fphar.2018.00039
4. Peverini L, Beudez J, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T. New insights into permeation of large cations through ATP-gated P2X receptors. *Front Mol Neurosci.* (2018) 11:265. doi: 10.3389/fnmol.2018.00265

5. Adriouch S, Haag F, Boyer O, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD(+): a danger signal hindering regulatory T cells. *Microbes Infect.* (2012) 14:1284–92. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.011
6. Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. ADP-ribosylation of P2X7: a matter of life and death for regulatory T cells and natural killer T cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* (2015) 384:107–26. doi: 10.1007/82_2014_420
7. Gilbert S, Oliphant C, Hassan S, Peille A, Bronsert P, Falzoni S, et al. ATP in the tumour microenvironment drives expression of nP2X 7, a key mediator of cancer cell survival. *Oncogene.* (2019) 38:194–208. doi: 10.1038/s41388-018-0426-6
8. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One.* (2008) 3:e2599. doi: 10.1371/journal.pone.0002599
9. Young CNJ, Górecki DC. P2RX7 purinoceptor as a therapeutic target—the second coming? *Front Chem.* (2018) 6:248. doi: 10.3389/fchem.2018.00248
10. Perregeaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol.* (2000) 165:4615–23. doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4615
11. Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on mouse T cells: one channel, many functions. *Front Immunol.* (2015) 6:204. doi: 10.3389/fimmu.2015.00204
12. Sommer A, Kordowski F, Büch J, Maretzky T, Evers A, Andrä J, et al. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun.* (2016) 7:11523. doi: 10.1038/ncomms11523
13. Stark R, Wesselink TH, Behr FM, Kragten NAM, Arens R, Koch-Nolte F, et al. TRM maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7. *Sci Immunol.* (2018) 3:eaau1022. doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.AAU1022
14. Rissiek B, Lukowiak M, Raczkowski F, Magnus T, Mittrücker HW, Koch-Nolte F. Blockade of murine ARTC2.2 during cell preparation preserves the vitality and function of liver tissue-resident memory T cells. *Front Immunol.* (2018) 9:1580. doi: 10.3389/fimmu.2018.01580
15. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, et al. Extracellular NAD+ shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med.* (2010) 207:2561–8. doi: 10.1084/jem.20091154
16. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity.* (2017) 47:15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020
17. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: a main player in inflammation. *Biochem Pharmacol.* (2018) 151:234–44. doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.021
18. Hofman P, Cherfils-Vicini J, Bazin M, Ilie M, Juhel T, Hébuterne X, et al. Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cancer Res.* (2015) 75:835–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1778
19. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X 7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol.* (2002) 168:6436–45. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6436
20. Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, et al. P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* (2008) 5:33. doi: 10.1186/1742-2094-5-33
21. Park J-H, Kim Y-C. P2X7 receptor antagonists: a patent review. (2010–2015). *Expert Opin Ther Pat.* (2017) 27:257–67. doi: 10.1080/13543776.2017.1246538
22. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* (2009) 15:1170–8. doi: 10.1038/nm.2028
23. Adinolfi E, Capece M, Franceschini A, Falzoni S, Giuliani AL, Rotondo A, et al. Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7. *Cancer Res.* (2015) 75:635–44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1259
24. Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, et al. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell.* (2005) 16:3260–72. doi: 10.1091/mbc.e04-11-1025
25. Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, Cavagna D, et al. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem.* (2009) 284:10120–8. doi: 10.1074/jbc.M805805200
26. Roger S, Jelassi B, Couillin I, Pelegrin P, Besson P, Jiang L-H. Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta.* (2015) 1848:2584–602. doi: 10.1016/j.bbame.2014.10.029
27. Roger S, Pelegrin P. P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. *Expert Opin Investig Drugs.* (2011) 20:875–80. doi: 10.1517/13543784.2011.583918
28. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.* (2012) 72:2957–69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1947
29. Hattori F, Ohshima Y, Seki S, Tsukimoto M, Sato M, Takenouchi T, et al. Feasibility study of B16 melanoma therapy using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X7. *Eur J Pharmacol.* (2012) 695:20–6. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.09.001
30. Solle M, Labasi J, Perregeaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem.* (2001) 276:125–32. doi: 10.1074/jbc.M006781200
31. Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, et al. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* (2005) 114:386–96. doi: 10.1016/j.pain.2005.01.002
32. Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, et al. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem.* (2009) 284:25813–22. doi: 10.1074/jbc.M109.033134
33. Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Sojka DK, Richardson JC, Sheardown SA, Harrison SM, et al. Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses. *J Leukoc Biol.* (2009) 85:978–86. doi: 10.1189/jlb.0408251
34. Masin M, Young C, Lim K, Barnes SJ, Xu XJ, Marschall V, et al. Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts. *Br J Pharmacol.* (2012) 165:978–93. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01624.x
35. Chen L, Brosnan CF. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol.* (2006) 176:3115–26. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3115
36. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev.* (2014) 66:638–75. doi: 10.1124/pr.113.008003
37. Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, et al. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife.* (2018) 7:e36217. doi: 10.7554/eLife.36217
38. Faliti CE, Gualtierotti R, Rottoli E, Gerosa M, Perruzza L, Romagnani A, et al. P2X7 receptor restrains pathogenic T_H cell generation in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* (2019) 216:317–36. doi: 10.1084/jem.20171976
39. Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FW. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* (2011) 20:897–915. doi: 10.1517/13543784.2011.578068
40. Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, et al. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci.* (2007) 27:9525–33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0579-07.2007
41. Dell'Antonio G, Quattrini A, Dal Cin E, Fulgenzi A, Ferrero ME. Antinociceptive effect of a new P(2Z)/P2X7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats. *Neurosci Lett.* (2002) 327:87–90. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00385-3

42. Taylor SR, Turner CM, Elliott JI, McDaid J, Hewitt R, Smith J, et al. P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* (2009) 20:1275–81. doi: 10.1681/ASN.2008060559
43. Li Z, Krippendorff BE, Sharma S, Walz AC, Lavé T, Shah DK. Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments. *MAbs.* (2016) 8:113–9. doi: 10.1080/19420862.2015.1111497
44. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol.* (2009) 198:157–74. doi: 10.1007/s00430-009-0116-7
45. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* (2013) 82:775–97. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
46. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol.* (2017) 8:1603. doi: 10.3389/fimmu.2017.01603
47. Danquah W, Catherine MS, Rissiek B, Pinto C, Arnau SP, Amadi M, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med.* (2016) 8:366ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8463
48. Balazs AB, Ouyang Y, Hong CM, Chen J, Nguyen SM, Rao DS, et al. Vectored immunoprophylaxis protects humanized mice from mucosal HIV transmission. *Nat Med.* (2014) 20:296–300. doi: 10.1038/nm.3471
49. Saunders KO, Wang L, Gordon Joyce M, Yang Z-Y, Balazs AB, Cheng C, et al. Broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody gene transfer protects non-human primates from mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* (2015) 89:8334–45. doi: 10.1128/JVI.00908-15
50. Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, et al. ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J.* (2008) 22:861–9. doi: 10.1096/fj.07-9294com
51. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. Extracellular ATP and P2X7 receptor exert context-specific immunogenic effects after immunogenic cancer cell death. *Cell Death Dis.* (2016) 7:e2097. doi: 10.1038/cddis.2015.411
52. Hammami A, Allard D, Allard B, Stagg J. Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Semin Immunol.* (2019) 42:101304. doi: 10.1016/j.smim.2019.101304
53. Saunders KO, Wang L, Joyce MG, Yang ZY, Balazs AB, Cheng C, et al. Broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody gene transfer protects non-human primates from mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* (2015) 89:8334–45.
54. Adriouch S, Franck E, Drouot L, Bonneau C, Jolinon N, Salvetti A, et al. Improved immunological tolerance following combination therapy with CTLA-4/Ig and AAV-mediated PD-L1/2 muscle gene transfer. *Front Microbiol.* (2011) 2:199. doi: 10.3389/fmicb.2011.00199
55. Hardet R, Chevalier B, Dupaty L, Naïmi Y, Riou G, Drouot L, et al. Oral-tolerization prevents immune responses and improves transgene persistence following gene transfer mediated by adeno-associated viral vector. *Mol Ther.* (2016) 24:87–95. doi: 10.1038/mt.2015.146
56. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther.* (2008) 16:1648–56. doi: 10.1038/mt.2008.171
57. Kanellopoulos JM, Delarasse C. Pleiotropic roles of P2X7 in the central nervous system. *Front Cell Neurosci.* (2019) 13:401. doi: 10.3389/fncel.2019.00401
58. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, et al. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity.* (2003) 19:571–82. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00266-8

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Demeules, Scarpitta, Abad, Gondé, Hardet, Pinto-Espinoza, Eichhoff, Schäfer, Haag, Koch-Nolte and Adriouch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 4, Publication

A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 In Vivo

Henri Gondé, Mélanie Demeules, Romain Hardet, Allan Scarpitta, Marten Junge, Carolina Pinto-Espinoza, Rémi Varin, Friedrich Koch-Nolte, Olivier Boyer, Sahil Adriouch

Frontiers in immunology, DOI: 10.3389/fimmu.2021.704408 – PMID : 34489954

Contexte de l'étude. Sur les LT murins, la mono-ADP ribosyltransférase ARTC2.2 catalyse l'ADP-ribosylation de diverses protéines de surface lorsque le NAD⁺ est libéré dans le compartiment extracellulaire. L'ADP-ribosylation covalente du récepteur P2X7 par l'ARTC2.2 représente ainsi un mécanisme supplémentaire d'activation, complémentaire de son déclenchement par l'ATP extracellulaire. P2X7 est un récepteur polyvalent qui pourrait représenter une cible potentielle dans les maladies inflammatoires et neurodégénératives, ainsi que dans le cancer.

Méthode. Nous utilisons une approche expérimentale utilisant l'injection intramusculaire de vecteurs AAV recombinants (rAAV) codant pour des produits biologiques à base de nanobodies ciblant ARTC2.2 ou P2X7.

Principaux résultats.

- Une seule injection de rAAV1 ou rAAV8 codant pour des nanobodies spécifiques de P2X7 ou ARTC2.2 peut inhiber ou, au contraire potentialiser l'activation de P2X7 induite par l'ATP ou le NAD⁺ *ex vivo* sur les LT spléniques.
- Le test *ex vivo* de la perte de CD27 et CD62L dépendant de l'activation de P2X7 démontre qu'une unique injection du rAAV codant pour 13A7-hcAb bloquant P2X7 protège les LT contre cette perte induite par le NAD⁺ et l'ATP. De même, l'injection de rAAV codant pour s+16-dimHLE bloquant l'ARTC2.2 inhibe complètement la perte de CD27 et CD62L induite par le NAD⁺ mais pas par l'ATP. 14D5-dimHLE potentialisant P2X7 sensibilise les LT à la perte de CD27 et CD62L induite par le NAD⁺ et l'ATP.
- L'analyse des LT circulants et des Trm du foie de souris sacrifiées 120 jours après l'injection de l'AAVnano a révélé une occupation complète de l'ARTC2.2 par le S+16-dimHLE sur les LT CD4⁺ circulants et dans le parenchyme hépatique.
- Une dose plus faible de NAD⁺ injectées *in vivo* permet d'éliminer plus de Tregs chez les souris injectées avec le rAAV-14D5-dimHLE que chez les souris témoins.
- Dans une autre stratégie, basée sur la fusion de nanobodies spécifiques à des IgG2a de souris pour générer un format d'anticorps à chaînes lourdes (hcAb), nous démontrons une déplétion durable des cellules exprimant des niveaux élevés d'ARTC2.2 *in vivo*.

- Par la suite cette technologie nous permettra de tester des constructions bispécifiques.



A Methodological Approach Using rAAV Vectors Encoding Nanobody-Based Biologics to Evaluate ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo*

Henri Gondé^{1,2}, Mélanie Demeules¹, Romain Hardet¹, Allan Scarpitta¹, Marten Junge³, Carolina Pinto-Espinoza³, Rémi Varin^{1,2}, Friedrich Koch-Nolte³, Olivier Boyer^{1,4} and Sahil Adriouch^{1*}

¹ Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies, Rouen, France, ² Rouen University Hospital, Department of Pharmacy, Rouen, France, ³ Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁴ Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Serge Muyldermans,
Vrije University Brussel, Belgium

Reviewed by:

Luciana D'Apice,
National Research Council (CNR), Italy
Arantazu Alfranca,
Hospital de la Princesa, Spain

*Correspondence:

Sahil Adriouch
sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 02 May 2021

Accepted: 03 August 2021

Published: 19 August 2021

Citation:

Gondé H, Demeules M,
Hardet R, Scarpitta A, Junge M,
Pinto-Espinoza C, Varin R,
Koch-Nolte F, Boyer O and Adriouch S
(2021) A Methodological Approach
Using rAAV Vectors Encoding
Nanobody-Based Biologics to
Evaluate ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo*.
Front. Immunol. 12:704408.
doi: 10.3389/fimmu.2021.704408

On murine T cells, mono-ADP ribosyltransferase ARTC2.2 catalyzes ADP-ribosylation of various surface proteins when nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is released into the extracellular compartment. Covalent ADP-ribosylation of the P2X7 receptor by ARTC2.2 thereby represents an additional mechanism of activation, complementary to its triggering by extracellular ATP. P2X7 is a multifaceted receptor that may represent a potential target in inflammatory, and neurodegenerative diseases, as well as in cancer. We present herein an experimental approach using intramuscular injection of recombinant AAV vectors (rAAV) encoding nanobody-based biologics targeting ARTC2.2 or P2X7. We demonstrate the ability of these *in vivo* generated biologics to potently and durably block P2X7 or ARTC2.2 activities *in vivo*, or in contrast, to potentiate NAD⁺- or ATP-induced activation of P2X7. We additionally demonstrate the ability of rAAV-encoded functional heavy chain antibodies to elicit long-term depletion of T cells expressing high levels of ARTC2.2 or P2X7. Our approach of using rAAV to generate functional nanobody-based biologics *in vivo* appears promising to evaluate the role of ARTC2.2 and P2X7 in murine acute as well as chronic disease models.

Keywords: P2X7 (purino) receptor, AAV vectors, nanobodies (V_{HH}), animal models, extracellular ATP (eATP), extracellular NAD⁺, methodological approach

INTRODUCTION

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is a key molecule in cellular metabolism and acts as an intermediate in several essential enzymatic reactions (1). In addition, in response to cellular stress, intracellular NAD⁺ is released into the extracellular compartment and serves as a substrate for various ectoenzymes (2, 3). Mono-ADP ribosyl transferases (ART) represent a family of ectoenzymes that use extracellular NAD⁺ to catalyze posttranslational modification of cell surface proteins by the transfer of ADP-ribose to specific amino-acid residues (4, 5). In mice, the ART

family comprises six members: ARTC1-5, including two isoforms of ARTC2, termed ARTC2.1 and ARTC2.2 (6). While ARTC2.1 is enzymatically inactive in the absence of reducing agents, ARTC2.2 is active in standard conditions and is able to ADP-ribosylate multiple cell-surface protein-targets when NAD^+ is present in the extracellular space (7, 8). ARTC2.2 is localized predominantly on the surface of murine T cells as a 35 kDa GPI-anchored ectoenzyme. Although its levels of expression varies depending on mouse strain and cell-activation status, membrane expression of ARTC2 remains overall higher on CD8^+ T cells as compared to CD4^+ T cells (9). When murine T cells are exposed to micromolar levels of extracellular NAD^+ , ARTC2.2 catalyzes the ADP-ribosylation of exposed arginines in several cell surface protein targets, including the purinergic P2X7, a well described protein expressed by immune cells and involved in immune regulation (10, 11).

P2X7 assembles at the cell surface as a homo-trimeric receptor that forms a nonselective ion channel upon gating with high extracellular ATP concentrations (*i.e.*, in the hundreds micromolar range). Depending on ATP concentration and on the extent of cell exposition, activation of P2X7 receptor can lead to multiple cellular events starting by the rapid activation of surface metalloproteases (leading to shedding for instance of CD62L and CD27) and by the externalization of phosphatidylserine (11). Prolonged P2X7 receptor activation induces the formation of nonselective pores and to massive membrane depolarization, ultimately leading to cell death (3). Interestingly, prolonged P2X7 activation can also be triggered by brief exposition to extracellular NAD^+ . Indeed, in the presence of extracellular NAD^+ , ARTC2.2 catalyzes covalent ADP-ribosylation of P2X7 at the arginine residue 125, located in the vicinity of the ATP-binding site, and thereby triggers the activation of P2X7 receptor (10). Remarkably, much lower concentrations of extracellular NAD^+ (*i.e.*, in the micromolar range) are sufficient to activate P2X7 receptor and to induce cell death (12, 13). This process was termed NAD-induced cell death (NICD) and demonstrated to play a major role *in vivo* in the fate and regulation of immune cells that express high levels of ARTC2.2 and P2X7, including regulatory T cells (Treg), invariant NKT cells, follicular helper T cells (Tfh), and tissue-resident memory T cells (T_{RM}) (12, 14–18).

Nanobodies are derived from unconventional natural antibodies devoid of light chains that are found in llamas and other camelids (19–21). The single-chain variable fragment of the so-called heavy-chain antibodies is termed V_{HH} or nanobody. Nanobodies exhibit similar specificities and affinities than conventional antibodies but are smaller in size (15 kDa) and present a complementary determining region 3 (CDR3) that is usually longer, with the remarkable propensity to reach protein cavities that are otherwise difficult to target with conventional antibodies, offering opportunities to engineer these molecules into original biologics (22). Such cavities often

correspond to functional regions and allosteric sites, conferring to nanobodies the ability to act as modulators of enzyme and receptor activities (*e.g.*, potentiating or blocking). Anti-ARTC2.2 nanobodies have been isolated by phage display from llamas immunized with cDNA expression vectors encoding full-length ARTC2.2 (23). Nanobodies s-14, s+16a, s+16b and l-17 are able to bind with high specificity cell line stably transfected to express ARTC2.2. In addition, T cells can be protected from NICD by ARTC2.2-blocking nanobodies s+16a, s+16b and l-17, but not s-14 (23). In additional studies, intravenous (*i.v.*) injection of the ARTC2.2-blocking nanobody s+16a prevented NICD in cells co-expressing ARTC2.2 and P2X7 *ex vivo* as well as *in vivo*. ARTC2.2 antagonism has hence been recognized as a crucial step for the functional studies of Treg, NKT and T_{RM} subsets (14–16, 24). Anti-P2X7 nanobodies were generated in a similar manner (25, 26). Taking advantage of the single-chain structure of nanobodies, we derived highly specific P2X7-potentiating nanobody 14D5 and P2X7-blocking nanobody 13A7 either as homodimers fused to the Alb8 albumin-binding nanobody (*i.e.*, to provide improved half-life *in vivo*) or fused to the Fc-region of mouse conventional antibody to reconstitute the bivalent heavy chain antibody (hcAb) format of camelids (25, 27). Nanobody-based hcAb therefore offer the possibility not only to increase their half-life *in vivo* but also to provide effector functions related to the Fc-region that can bind to Fc-receptors (FcR) at the surface of immune cells or activate the classical complement cascade (26). Depending on the isotype, it is then possible to promote antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cell cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent phagocytosis (ADCP). Interestingly, hinge and/or Fc-region engineering can further enhance Fc-fused nanobody half-life or fine tune effector properties by enhancing or abolishing Fc γ R and/or complement related effector functions (28).

In this study, we report two different strategies for manipulating the ARTC2.2/P2X7 pathway *in vivo*, with the aim of better addressing the versatile role of NAD^+ and ATP in immune cells. For that, we developed a methodology that rely on nanobody-based biologics expressed directly *in vivo* upon a single intramuscular (*i.m.*) administration of recombinant AAV vectors (rAAV) encoding the biological constructs. We demonstrated here the ability to durably block the activity of ARTC2.2 enzyme or of the P2X7 ion channel *in vivo* upon a single *i.m.* injection of the rAAV encoding a construct containing the ARTC2.2-blocking nanobody s+16a, or a construct containing the P2X7-blocking nanobody 13A7. In addition, we provide evidence that P2X7 can be potentiated *in vivo* using an rAAV encoding a construct containing the P2X7-potentiating nanobody 14D5. In another strategy, based on the fusion of specific nanobodies to mouse IgG2a, to generate a heavy chain antibody (hcAb) format, we demonstrate durable depletion of cells expressing high levels of ARTC2.2 *in vivo*. These methodologies represent valuable tools that might be used in future studies to better delineate the role of the NAD^+ /ARTC2.2/P2X7 pathway *in vivo* in various pathophysiological situations including inflammatory diseases, and immune responses to infectious pathogens or to tumor cells.

Abbreviations: NAD^+ , nicotinamide adenine dinucleotide; ART, ADP-ribosyltransferase; hcAb, heavy chain antibody; dimHLE, dimer half-life extended; rAAV, recombinant adeno-associated virus used as a vector; AAVnano, methodological approach based on the injection of rAAV encoding for nanobody-based biologics.

MATERIAL AND METHODS

Mice, Reagents, Antibodies

C57BL/6 wild-type mice obtained from Janvier Labs were used for all experiments. Mice were housed in a specific pathogen-free facility and were aged of 8 weeks at the beginning of experiments. All animal experiments were approved by the local institutional ethic committee.

Adenosine 5'-tri-phosphate disodium salt (A2383) and β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (N7004) were purchased from Sigma Aldrich. Red blood cell (RBC) lysis/fixation Solution, True-Nuclear transcription factor buffer set, fluorochrome-conjugated streptavidin, and antibodies to CD45 (clone 30-F11), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC-61), CD19 (1D3/CD19), B220 (RA3-6B2), FoxP3 (MF-14), CD27 (LG.3A10), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3) or P2X7R (1F11), and purified CD16/CD32 (TruStain FcX) were obtained from Biolegend or Sony Biotechnology. Rabbit polyclonal antibody K1G, specific to mouse P2X7, was described in our previous studies (12, 13). K1G was used to stain P2X7 at the surface of blood myeloid cells as illustrated in **Supplemental Figure 3**, using a secondary donkey anti-rabbit IgG from Jackson ImmunoResearch. Biotinylated polyclonal antibody specific to mouse IgG_a was obtained from Jackson ImmunoResearch and monoclonal antibody to ARTC2.2 (Nika102) from Novus Biologicals.

Flow Cytometry Analyses

For evaluation of P2X7 and ARTC2.2 expression on T cells, splenocytes were collected and single-cell suspensions were prepared and washed using standard procedures. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies, including anti-P2X7 and anti-ARTC2.2 or related isotype controls before fixation and red blood cell lysis using the RBC lysis/fixation Solution (Sony biotechnology).

For evaluation of P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L upon *ex vivo* exposition to NAD⁺ or ATP, blood samples were collected, washed, resuspended into PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺), and divided into 4 tubes. Cells were then treated with 30 μ M ATP, 150 μ M ATP, or 30 μ M NAD⁺, or left untreated. After incubation for 15 min at 37°C, cells were washed in cold D-PBS containing 10% FBS, and stained on ice with fluorochrome-conjugated antibodies before fixation and RBC lysis. The percentages of cells co-expressing CD27 and CD62L were then evaluated by flow cytometry.

For evaluation of the binding of the dimHLE constructs on liver NKT cells and liver T_{RM}, single cells suspension were prepared and stained with a mouse IgG1 mAb that specifically recognizes the Alb8 nanobody (kindly provided by Dr. Catelijne Stortelers, Ablynx nv, Zwijnarde, Belgium), followed by a secondary mouse IgG1-specific mAb. To evaluate the levels of occupation of the target protein, cells were incubated *in vitro* with a saturating concentration of the same recombinant nanobody construct as the one produced *in vivo*, followed by the same secondary detection reagents. This allowed estimation of signal saturation that correlates with target occupation by bounded biologics. Similar MFI were obtained with or without

addition *in vitro* of the corresponding recombinant nanobody construct, confirming that target occupancy reached saturation *in vivo* (data not shown). To distinguish vascular T cells from liver parenchyma cells, a fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb has been injected i.v. (CD45iv) 3 min before sacrifice and preparation of liver lymphocytes. This procedure allowed the staining of vascular T cells *in vivo* (CD45iv^{high}) while liver resident T cells remained mostly unstained (CD45iv^{low}). Untransduced mice additionally received 50 μ g of recombinant s+16a-dim construct (i.e., a dimer of s+16a that does not contain the Alb8 nanobody, and that cannot be detected by the anti-Alb8 mAb77 detection system) 30 min before organ collection to prevent NICD and cell loss *ex vivo* during cell preparation, as described earlier (15, 18). All cells were counterstained with mAbs directed against CD45 (coupled to a different fluorochrome than CD45iv), CD4, and CD69 (marker of tissue resident lymphocytes). To distinguish the NKT subset, cells were stained with PE-conjugated CD1d-tetramer loaded with, an analogue of α -galatosylceramide (α Gal/Cer), kindly provided by the NIH tetramer core facility.

For evaluation of the binding capacity of the nanobody-based hcAb on T cells surface, samples were collected, washed, resuspended into FACS buffer and stained with isotype specific secondary antibodies, i.e. Ab directed against mouse IgG1 (to detect 13A7-IgG1^{LSF} hcAb), or Ab directed against mouse IgG2a (for detection of 7E2-IgG2a or s-14-IgG2a hcAb). Cells were washed and counterstained with fluorochrome-conjugated antibodies directed against the indicated cell surface markers.

Flow cytometry measurements were performed using a LSRFortessa or a FACSCanto-I (BD Biosciences) apparatus and subsequent analyses were performed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Nanobody Constructs

Some of the constructs used in this study were based on nanobody dimers ("dim" format) fused to the Alb8 anti-albumin nanobody (half-life extended "HLE" format) (25, 29). 14D5-dimHLE and s+16a-dimHLE were constructed by fusing the coding sequences of two 14D5 nanobodies or two s+16a nanobodies using a 35-GS linker (GGGGS)₇. These homodimeric bivalent constructs were then fused to the anti-albumin nanobody Alb8 *via* a 9-GS linker (GGGSGGGGS) (25). The P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb was constructed by fusing the nanobody 13A7 to the hinge region and Fc region of a mutated mouse IgG1 antibody carrying the "LSF" mutations (T252L, T254S, T256F) (30). For the design of the depleting hcAb constructs 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a, anti-P2X7 nanobody 7E2 or anti-ARTC2.2 nanobody s-14, were fused to the hinge and Fc-region of a mouse IgG2a using 5-GS linker (GGGGS).

Production of rAAV and Muscle Transduction

For the production of rAAV, all constructs were cloned into a pFB plasmid under the control of either a CBA promoter (for rAAV1 constructs encoding 14D5-dimHLE, 13A7-IgG1^{LSF} and s+16a-dimHLE) or under the related CASI promoter (for rAAV8

constructs encoding 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a) (31, 32). Production, purification, and titration of rAAV1 and rAAV8 were performed by Virovek (Hayward, California, USA) using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells (31). For muscle transduction, mice hind legs were shaved under anesthesia and 100 μ L diluted rAAV were injected into 4 gastrocnemius muscle sites to reach a total dose of 10^{11} viral genomes (vg) per mouse.

NAD⁺ Treatment *In Vivo*

Injections of rAAV encoding either 13A7-IgG1^{LSF} hcAb or 14D5-dimHLE were performed i.m. on day 0 and followed 28 days later by the i.v. injection of 30 mg NAD⁺ diluted in 200 μ L PBS (pH adjusted to 7.4) as described earlier (24). Splenocytes were collected 24 h later and single-cell suspensions were prepared on ice and stained with fluorochrome-coupled antibodies. After fixation, RBC lysis, permeabilization and intracellular staining, single cell suspensions were analyzed by flow cytometry. Absolute cell numbers collected for each spleen was evaluated by direct enumeration using an automated cell counter (ADAM-MC apparatus). Percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were determined by flow cytometry and compared to CD19⁺ B cells taken as an NAD⁺-insensitive reference population.

Statistical Analysis

All data are shown as mean values and error bars represent standard error of the mean (SEM). Statistical comparison between experimental groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***). All calculations were performed using the Prism software (Graphpad, La Jolla, CA).

RESULTS

Nanobody Constructs and rAAV Used to Study the Role of ARTC2.2 and P2X7 *In Vivo*

The ARTC2.2/P2X7 axis regulates murine T cell function, differentiation and cell fate. Both proteins are expressed on T cell subsets but at different cell surface levels. Consistent with previous studies (12, 13, 24), P2X7 and ARTC2.2 were detected on CD4⁺CD25⁺ Treg, CD4⁺CD25⁻ conventional CD4⁺ T cells (Tconv), and on CD8⁺ T cells. P2X7 is expressed at higher level on the surface of Treg and to a lesser extent on CD4⁺ Tconv and on CD8⁺ T cells (Figure 1A, upper panels). ARTC2.2 is expressed at higher levels on CD8⁺ T cells as compared to CD4⁺ T cell subsets (Figure 1A, lower panels). To explore the role of P2X7 and ARTC2.2 *in vivo*, we developed a methodological approach based on rAAV encoding various formats of P2X7-specific or ARTC2.2-specific nanobody-based constructs. To increase their half-life and avidity, we developed bivalent nanobodies fused to the albumin-specific nanobody Alb8 (dimer Half-Life Extended format, termed “dimHLE”)

(Figure 1B). In a second approach, we fused nanobodies to the hinge and Fc region of conventional IgG antibodies (heavy-chain antibodies format, “hcAb”) (Figure 1B). Mouse IgG1 Fc subclass is known to only mediate low, if any, effector functions as it binds to the inhibitory Fc γ RIIB and to only one member of the activating receptors, the low affinity Fc γ RIII (33). IgG1 also binds to the neonatal FcRn involved in antibody recycling and persistence *in vivo*. To further increase the half-life of our constructs, we took advantage of the described “LSF” point mutations (*i.e.*, T252L, T254S, T256F), known to further ameliorate *in vivo* persistence by increasing the binding to FcRn (30), to generate the mIgG1^{LSF} hcAb construct (Figure 1B). In contrast to mouse IgG1, mIgG2a subclass binds all mouse activating Fc γ R and triggers Fc-related effector functions (Figure 1B) (33).

In our methodological approach to target ARTC2.2 and P2X7 on T cells *in vivo*, implemented and evaluated here, we injected rAAV1 or rAAV8 encoding nanobody-based constructs instead of the corresponding purified recombinant proteins. Both rAAV1 and rAAV8 serotypes are known to efficiently transduced muscle cells upon i.m. injection. We aimed at eliciting directly *in situ* the long-term and stable production of the selected construct following a single administration of the corresponding rAAV. This approach was termed AAVnano (Figure 1C).

We explored here two complementary strategies for manipulating *in vivo* the NAD⁺ pathway dependent on ARTC2.2 and P2X7. (Figure 2). The first strategy relies on the propensity of nanobodies to bind to functional sites and thereby modulate their enzymatic activity or receptor functions. We used constructs based on nanobodies selected for their remarkable ability to block ARTC2.2 enzymatic activity (nanobody s+16a, used here as a dimHLE format), to inhibit gating of the P2X7 ion channel (nanobody 13A7, used as IgG1^{LSF} hcAb format), or to potentiate P2X7 activity (nanobody 14D5, used as dimHLE format) (Figure 2A). The choice of the format for each biological construct (*i.e.*, dimHLE, or IgG1^{LSF} hcAb formats) was based on preliminary experiments comparing the efficacy of each formats (data not shown). The second strategy relies on the possibility to deplete target cells expressing high levels of ARTC2.2 or P2X7. For that, we used hcAb engineered to contain the mIg2a Fc-region, known to promote binding to FcR on immune cells and to promote ADCC by NK cells, ADCC by macrophages, and to facilitate CDC upon engagement on the classical complement pathway (Figure 2B). To facilitate the interpretation of their effect *in vivo*, these latter constructs were based on other nanobodies that do not modulate the functional activity of their target (*i.e.*, ARTC2.2-specific nanobody s-14 (23) and P2X7-specific nanobody 7E2 (25)) that were fused to the hinge and Fc-region of mouse IgG2a (Figures 1B, C).

Functional Modulation of ARTC2.2 or P2X7 Using rAAV Coding for Biologics With Blocking or Potentiating Properties

To evaluate our AAVnano approach and the ability of our constructs to modulate their target proteins, we first indirectly studied the activity of P2X7 and ARTC2.2 on T cells harvested

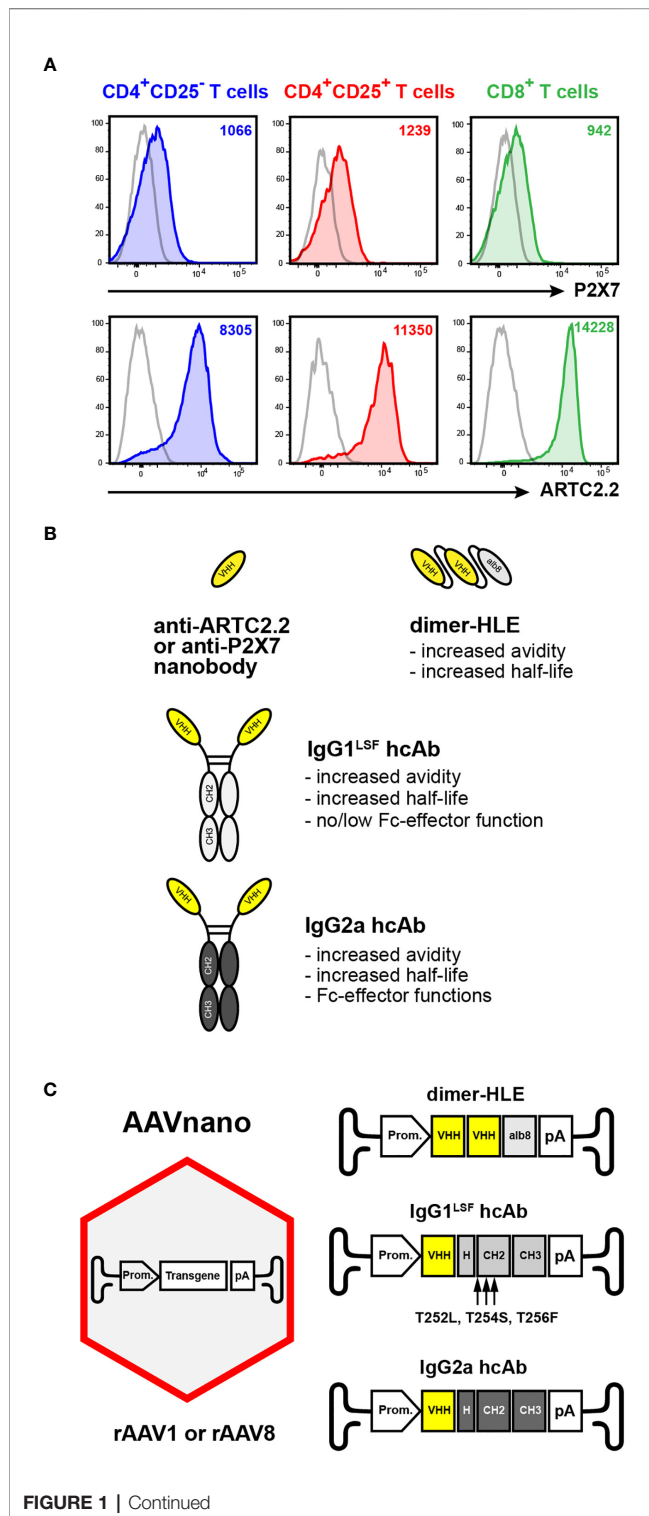


FIGURE 1 | AAVnano methodological approach to study the role of P2X7 or ARTC2.2 *in vivo*. **(A)** Expression of ARTC2.2 and P2X7 T cell subsets.

Splenocytes from C57BL/6 mice were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies directed against P2X7 (clone 1F11), or ARTC2.2 (clone Nika102), or with the corresponding isotype controls (grey), and were analyzed by flow cytometry. Cells were gated on CD4⁺CD25⁻ T cells (Tconv, depicted in blue), on CD4⁺CD25⁺ (Treg, depicted in red), or on CD8⁺ T cells (depicted in green) to evaluate the cell surface levels of P2X7 or ARTC2.2 on each subset. The numbers in the upper right quadrants indicate the mean fluorescence intensity (MFI). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to BV510), CD4 (BV786), CD8 (BV605), CD25 (PE-Cy7), P2X7 (BV421) and ARTC2.2 (AF647).

(B) Schematic representation of nanobody-based constructs. ARTC2.2-specific and P2X7-specific nanobodies (V_H) are engineered either as bivalent dimers fused to the albumin-specific nanobody Alb8 (dimer half-life extended, termed "dimHLE"), or as heavy-chain antibodies (termed hcAb) when fused to the hinge and Fc-region of conventional mouse IgG antibodies. For the latter, nanobodies were fused to either a mouse IgG1 hinge/Fc-region bearing the LSF mutations (*i.e.*, T252L, T254S, T256F) to produce hcAb with no/low Fc-effector functions, or to the hinge/Fc-region of mouse IgG2a to generate cell-depleting hcAb. **(C)** Schematic representation of the AAVnano methodological approach and the structure of the transgenes incorporated in the rAAV (of serotype 1 or 8). The illustrated transgenes encode the nanobody-based constructs depicted in **(B)** Upon a single i.m. injection of the rAAV, the nanobody-based biologics are produced *in vivo* by the transduced muscle cells under the control of a CBA (rAAV1) or a CASI (rAAV8) promoter (Prom.).

rAAV1 encoding 13A7-IgG1^{LSF} hcAb (*i.e.*, to inhibit P2X7), 14D5-dimHLE (*i.e.*, to potentiate P2X7), or s+16a-dimHLE (*i.e.*, to inhibit ARTC2.2). Blood cells were collected 17–120 days after rAAV injection, incubated at 37°C in the absence or in the presence of NAD⁺ (30 μM) or ATP (30 μM or 150 μM) to assay *ex vivo* P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L. Representative data obtained 30 days after AAVnano injection are shown in **Figure 3**. Comparable results were obtained from the earliest studied time point at day 17 to the last time point of the study at day 120. The results show that T cells from untransduced mice displayed P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L within 15 min after incubation with ATP or NAD⁺ (**Figures 3A, B**). This was noticeably more pronounced on CD4⁺CD25⁺ Treg that express higher levels of P2X7 as compared to Tconv and to CD8⁺ T cells (**Figure 3B**). Injection of AAVnano coding for 14D5-dimHLE sensitized T cells to P2X7-dependent shedding, notably also on the T cell subsets that express the lowest levels of P2X7 (*i.e.*, Tconv and CD8⁺ T cells) as compared to untransduced control mice. In contrast, mice injected with the AAVnano coding for 13A7-IgG1^{LSF} hcAb were almost completely protected from NAD⁺- and ATP-induced P2X7 activation, and only Treg cells displayed limited CD27 and CD62L shedding when incubated with the highest dose of ATP (**Figure 3B**). T cells from mice injected with the AAVnano coding for s+16a-dimHLE were protected from NAD⁺-induced, but not from ATP-induced shedding of CD27 and CD62L, as expected from a nanobody construct that inhibits ARTC2.2 activity (**Figure 3B**). For comparison, we also evaluated the effects mediated by recombinant nanobody-based biologics added directly *in vitro* on cells from untreated animals (**Supplemental Figure 1**). We observed in dose-response experiments that each recombinant construct used at

from AAVnano injected mice. Exposure of T cells to ATP or NAD⁺ induces the shedding of CD27 and CD62L by metalloproteases and this can be used as a sensitive assay to monitor P2X7 receptor activation (13, 24). For that, we injected

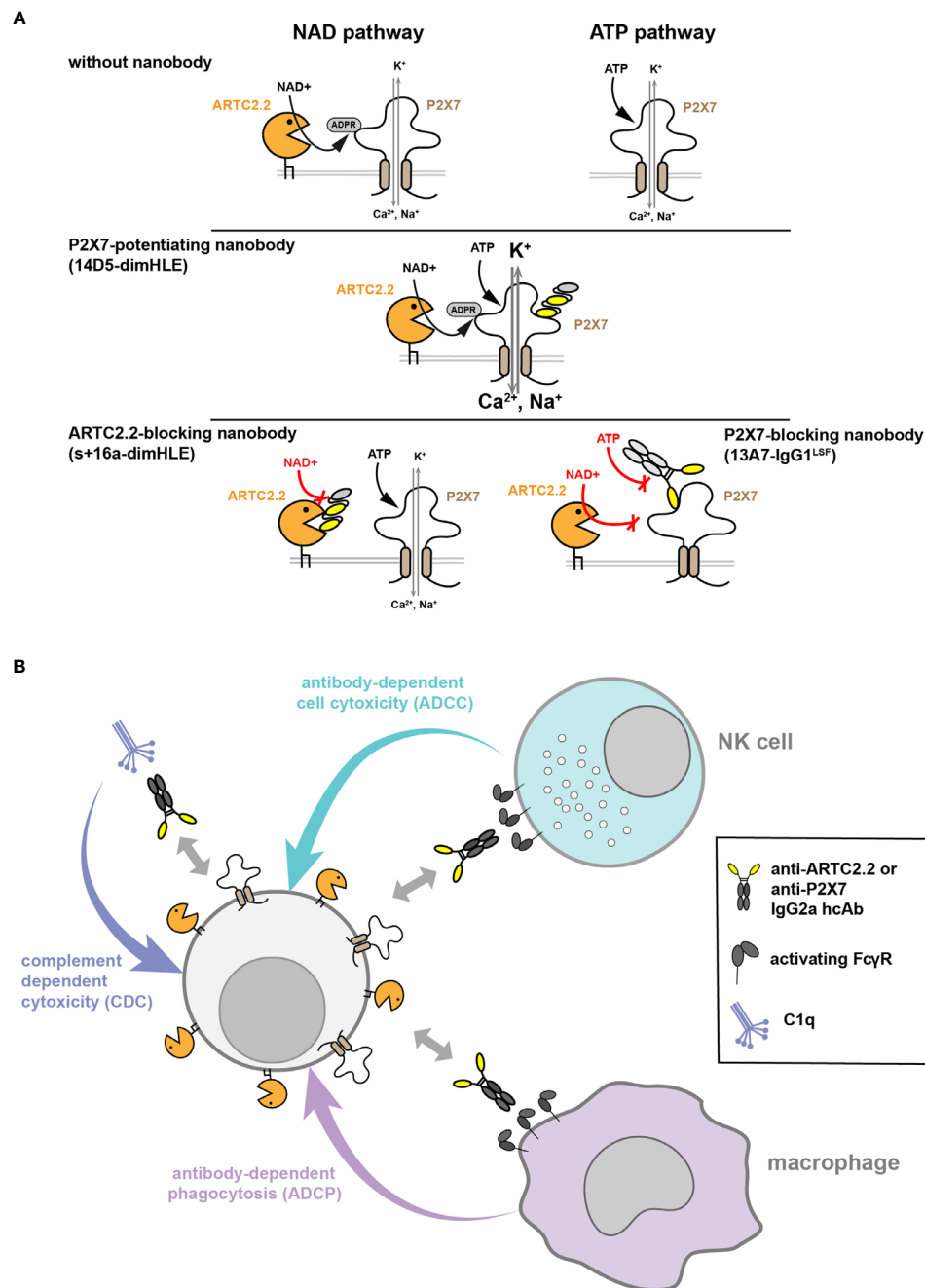


FIGURE 2 | Strategies used to manipulate ARTC2.2 or P2X7 functions *in vivo* or to deplete T cells expressing these proteins. **(A)** Modulation of ARTC2.2 and P2X7 activity using nanobody-based constructs. Two pathways can lead to the activation of P2X7 at the surface of mouse T cells. The ATP pathway involves direct gating of P2X7 ion channel by extracellular ATP. The NAD⁺ pathway involves a post-translational modification of P2X7 catalyzed by the ectoenzyme ARTC2.2 resulting in its covalent ADP-ribosylation. The 14D5-dimHLE construct probably binds to an allosteric site on P2X7 and potentiates gating of the ion channel triggered by either ATP or NAD⁺. The s+16a-dimHLE construct was designed to block ARTC2.2 enzymatic activity *in vivo* and thereby to inhibit activation of P2X7 by the NAD⁺ pathway (but not the ATP pathway). The 13A7-IgG1^{LSF} hcAb construct inhibits P2X7 gating and can be used to inhibit both ATP and NAD⁺ pathways. **(B)** Other nanobody-based constructs were designed to favor depletion of their target cells *in vivo*. For that, nanobodies s-14 and 7E2, that bind respectively to ARTC2.2 and P2X7 but do not modulate their functions, were fused to the hinge and Fc-region of mlgG2a. The resulting mlgG2a hcAb could mediate cell depletion through different mechanisms such as complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) that rely on NK cells, and antibody-dependent cell phagocytosis (ADCP) involving macrophages.

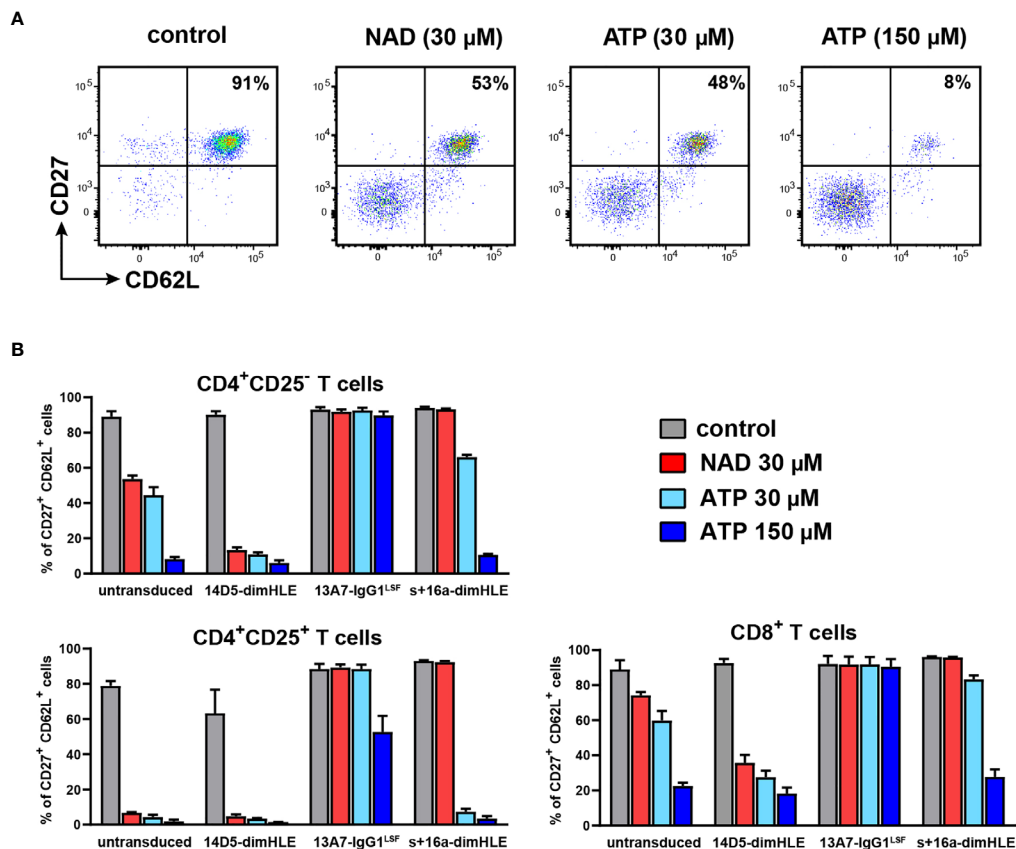


FIGURE 3 | AAVnano modulate P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L *ex vivo*. C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (control) or with rAAV1 encoding P2X7-potentiating 14D5-dimHLE, P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hAb or ARTC2.2-blocking s+16a-dimHLE. Blood samples were collected at different time points ranging from day 17 to day 120 after rAAV injections. Cells were then incubated for 15 min at 37°C with PBS, 30 μM ATP, 150 μM ATP or 30 μM NAD⁺ to induce P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L on T cells. Representative results obtained 30 days after rAAV injection are shown. **(A)** Representative flow cytometry plots illustrating shedding of CD27 and CD62L on gated CD4⁺CD25⁺ T cells harvested from control mice. Numbers indicate percentages of CD27⁺CD62L⁺ cells. **(B)** Mean percentages of CD27⁺CD62L⁺ cells among gated CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells after incubation with PBS (grey), 30 μM NAD⁺ (red), 30 μM ATP (cyan) or 150 μM ATP (blue). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to APC-Cy7), CD4 (FITC), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE), CD27 (PerCP-Cy5.5) and CD62L (APC). Errors bars represent the SEM, n=3.

saturating doses *in vitro* induced a comparable effect that the one observed *ex vivo* on cells collected from AAVnano transduced mice. These data hence suggest that i.m. injection of AAVnano induce *in vivo* production of each encoded construct in sufficient quantity to substantially inhibit or potentiate the functional activity of their target, at a level that appears to be similar to the one obtained *in vitro* with saturating doses of each given recombinant nanobody construct.

Evaluation of Tissue Resident T Cells *In Vivo* Following Administration of rAAV Coding for Biologics

To determine whether our methodological approach could be used to reach ARTC2.2 and P2X7 on tissue resident T cells, we next sought to detect the presence of the biologics on resident liver T cells 120 days after rAAV injection. For that, we focused at the end of the experiment (*i.e.*, upon sacrifice of animals) on

liver tissue-resident memory T cells (T_{RM}) and for comparison on liver vascular T cells as well. Liver T_{RM} co-express higher levels of ARTC2.2 and P2X7 than conventional T cells (18) (**Figure 4**). In order to discriminate tissue resident from vascular lymphocytes, we intravenously injected a fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb 3 min before sacrifice. In this short period of time, the injected antibody stains vascular, but not tissue resident lymphocytes (34). In order to detect the rAAV-encoded s+16a-dimHLE or 14D5-dimHLE, we used a monoclonal antibody (mAb77) that specifically recognizes the Alb8 nanobody, and for detection of 13A7-IgG1^{LSF}, we used a mouse IgG1-specific secondary antibody. We further stained cells with a CD4-specific mAb and an αGal/Cer-loaded CD1d tetramer to distinguish NKT cells from other CD4⁺ T cells. NKT cells are also known to co-express high levels of ARTC2.2 and P2X7 and to be highly sensitive to NAD⁺ induced cell death (NICD) (18). Cells were counterstained with a fluorochrome-

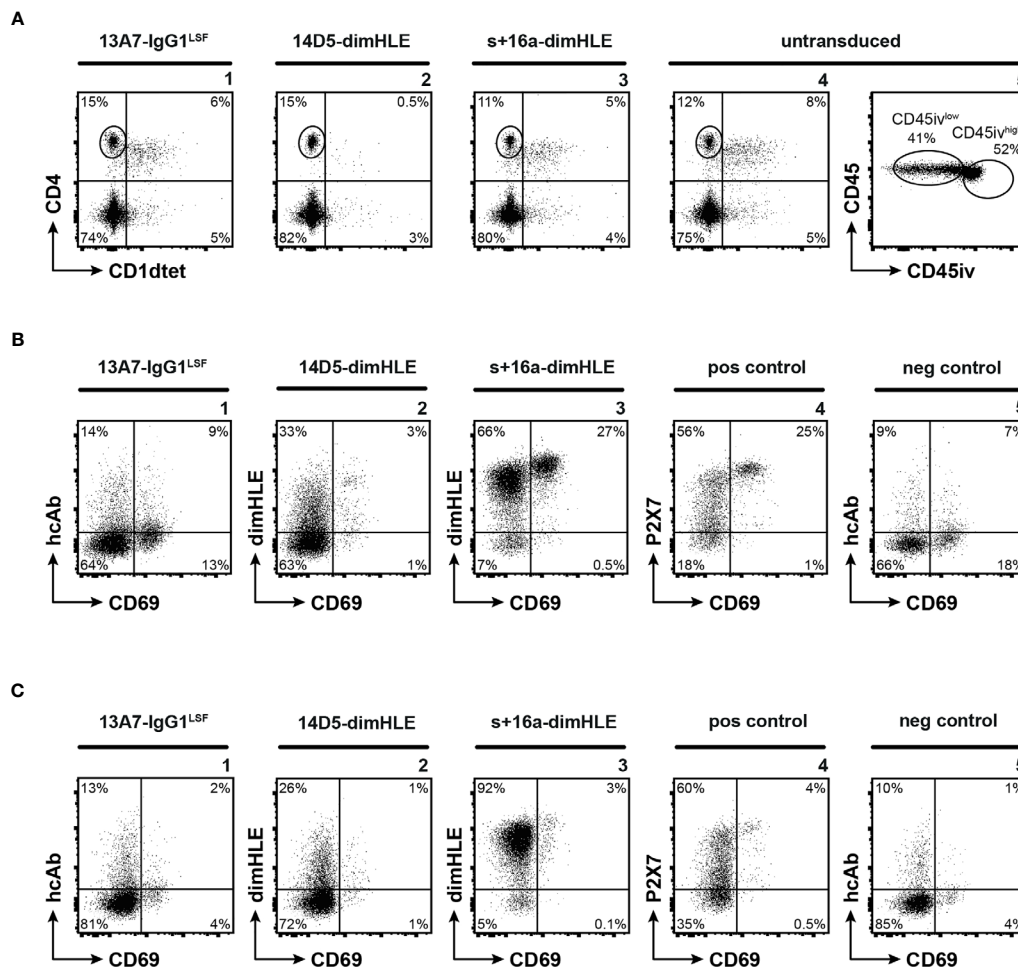


FIGURE 4 | Nanobody-based biologics produced *in vivo* following rAAV injection reach ARTC2.2 and P2X7 expressed at high levels by T_{RM} located in the liver parenchyma. C57BL/6 mice were injected i.m. with rAAV1 encoding P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb, P2X7-potentiating 14D5-dimHLE, or ARTC2.2-blocking s+16a-dimHLE, or with PBS (untransduced). 120 days after rAAV injection mice received an intravenous injection of fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb (CD45iv) 3 min before sacrifice. Untransduced mice additionally received 50 µg of recombinant s+16a-dim construct 30 min before organ collection to prevent NICD and cell loss *ex vivo* during cell preparation, as described earlier (15, 18). Cells extracted from the liver were then counterstained with mAbs directed against CD45, CD4, and CD69 (i.e., a marker of tissue resident lymphocytes) and with a CD1d-tetramer (CD1d tet) loaded with αGal/Cer (specifically labels the invariant T cell receptor of NKT cells). **(A)** Representative flow cytometry plots illustrating liver CD4⁺ T cells and CD4⁺CD1d tet⁺ NKT cells (panels 1–4), and the gating of parenchymal (CD45iv^{low}) and vascular (CD45iv^{high}) CD4⁺CD1d tet⁺ lymphocytes (panel 5). **(B, C)** Representative flow cytometry plots illustrating the detection of the nanobody-based constructs on the cell surface of tissue resident CD45iv^{low} **(B)** and vascular CD45iv^{high} **(C)** CD4⁺CD1d tet⁺ T cells. To detect cell surface bound dimHLE constructs, cells were stained with Alb8-specific mAb77 (mouse IgG1) followed by an mIgG1-specific secondary mAb. To detect cell surface bound 13A7-IgG1^{LSF}, cells were stained directly with the secondary mIgG1-specific mAb. Positive (pos) control staining was performed with liver cells from untransduced mice using the P2X7-specific 13A7-IgG1^{LSF}, mAb77, and the mIgG1-specific secondary mAb. Negative (neg) control staining was performed with the secondary detection reagents alone. Numbers indicate the percentages of cells in the respective quadrants or gates **(A, panel 5)**. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5 for the one injected *in vivo* and to AF700 for the one added *in vitro*), CD4 (APC), CD69 (FITC), mouse IgG1 (BV421) and CD1d tet (coupled to PE).

conjugated mAb against CD69, a marker that is highly expressed by many tissue resident T cells but by only few if any vascular T cells (35, 36). Untransduced mice were used as control and were given recombinant s+16a-dim 30 min before sacrifice to prevent NICD and cell loss during preparation as described before (15, 18). The results confirmed the higher level of ARTC2.2-specific s+16a-dimHLE bound at the surface of CD69⁺ T_{RM} as compared to tissue resident CD69⁻ CD4⁺ T cells and to vascular CD4⁺ T cells (**Figures 4B, C**, panels 3). Also, higher expression of P2X7

was detected at the surface of CD69⁺ T_{RM} compared to other CD4⁺ subsets (**Figures 4B, C** panels 4). In mice injected with rAAV1 encoding the ARTC2.2-specific s+16a-dimHLE, we observed high proportions of NKT cells and CD69⁺ T_{RM} as expected from an ARTC2.2-blocking biologics that protect from NICD that occurs during cells preparation (**Figures 4A, B**, panels 3). In contrast, liver lymphocytes obtained from mice injected with rAAV1 encoding the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE show markedly reduced percentages of tetramer-

stained NKT cells and of CD69⁺ T_{RM} (Figures 4A, B, panels 2), *i.e.* a cell populations that display high cell surface level of P2X7 (Figure 4B, panel 4). This likely reflects 14D5-dimHLE enhanced cell death of these subsets due to NAD⁺ released during liver collection and cell preparation (34). Liver lymphocytes recovered from mice injected 120 days earlier with rAAV1 encoding the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF}, contained high proportion of NKT cells (Figure 4A, panel 1) and of CD69⁺ T_{RM} (Figure 4B, panel 1), indicating that binding of 13A7-IgG1^{LSF} rendered these subpopulations resistant to NICD during cell preparation. However, the low level of staining with the IgG1-specific secondary antibody (Figure 4B, panel 1) suggests that this hcAb induced down modulation of cell surface P2X7, possibly by hcAb-induced endocytosis. This was not due to low binding of 13A7-IgG1^{LSF} at the surface of these cells as incubation of the cells *ex vivo* with a saturating dose of recombinant 13A7-IgG1^{LSF} followed by IgG1-specific secondary antibody did not increased the staining (data not shown). Similarly, in mice injected with rAAV1 encoding 14D5-dimHLE or s+16a-dimHLE, incubation of cells *ex vivo* with a saturating dose of the corresponding recombinant protein, followed by the appropriate secondary detection reagent, did not increased the staining intensity (not shown). This data indicate that each of these nanobody-based constructs produced *in vivo* achieved full occupancy of their respective target proteins expressed on vascular and tissue resident CD4⁺ T cells, as expected from their continuous endogenous production mediated by rAAV1 injection 120 days earlier.

Functional *In Vivo* Modulation of ARTC2.2 or P2X7 by rAAV Encoded Biologics

We next evaluated the effect of these biological constructs *in vivo*. First, we confirmed the absence of cell depletion using these AAVnano by evaluating the percentages of CD4⁺CD25⁺ Treg, CD4⁺CD25⁻ Tconv, and CD8⁺ T cells, throughout the study (data not shown). We then injected NAD⁺ *i.v.* and evaluated *in vivo* the modulating effect of the P2X7-specific constructs. As we previously demonstrated that the injection of 60 mg NAD⁺ provokes the depletion of 80% of Treg (24), we injected here a limited dose of 30 mg of NAD⁺ in order to evaluate the potentiating effect of 14D5-dimHLE. For that, mice were injected again with each AAVnano, followed 28 days after by the *i.v.* injection of 30 mg NAD⁺. Depletion of cell subsets was evaluated by collection and analyses of splenocytes one day after. As expected, untransduced mice showed a limited yet significant depletion of splenic Treg (Figures 5A, B), but not of other T cell subsets that express lower levels of P2X7. In contrast, mice injected with the AAVnano encoding 13A7-IgG1^{LSF} hcAb were protected from NAD⁺-induced Treg depletion. Remarkably, mice injected with the vector encoding the P2X7-potentiating construct 14D5-dimHLE showed significantly enhanced cell depletion, not only for Treg but also for the less sensitive Tconv and CD8⁺ T cell subsets, confirming the potentiating effect observed *ex vivo* (Figures 3B, 5B). These data provide evidence that P2X7 activity at the surface of T cell subsets can be modulated *in vivo* following a single injection of a rAAV1

encoding blocking or potentiating anti-P2X7 nanobody-based biologics.

Depletion *In Vivo* of Cells Expressing ARTC2.2 or P2X7 Using rAAV Coding for Nanobody-Based hcAb

Upon binding, conventional antibodies can promote target cell depletion through their Fc-related effector functions. We aimed here at evaluating P2X7-specific and ARTC2.2-specific hcAb that contain a neutral nanobody (*i.e.*, a nanobody that bind to its target but does not modulate its function) fused to the mouse IgG2a Fc-region, for their capacity to promote cell depletion *in vivo*. For that, we used again rAAV coding for these constructs that we termed 7E2-IgG2a hcAb for the one targeting P2X7, and s-14-IgG2a hcAb for the one directed against ARTC2.2. First, we evaluated the binding of each of these constructs to the surface of mouse T cell subsets. For that, serum from mice injected 63 days earlier with hcAb-encoding rAAV8 were collected and used as a source of hcAb. These sera were then incubated with splenocytes harvested from untreated naive mice and bound hcAb were detected by a IgG2a-specific secondary antibody (Figure 6A). Results confirmed higher binding of s-14-IgG2a hcAb on the surface of the CD8⁺ T cell subsets in agreement with the higher expression of its ARTC2.2 target on this subset (Figure 1A). 7E2-IgG2a hcAb was found to bind at lower levels than s-14-IgG2a hcAb at the surface of each studied T cell subsets, in agreement with the lower expression of P2X7 as compared to ARTC2.2 on these cell populations. Yet, 7E2-IgG2a hcAb was found to bind better on Treg than on Tconv and CD8⁺ T cells (Figure 6A), in agreement with the higher expression of P2X7 on Treg (Figure 1A). Titration analyses indicated that around 1 µl of serum contained saturating amounts of hcAb (Figure 6B). These results indicate that 7E2-IgG2a and s-14-IgG2a hcAb are produced in saturating amounts *in vivo* at least 63 days following a single *i.m.* injection of rAAV.

For comparison, and to evaluate the kinetic and relative abundance of hcAb production *in vivo*, we also used sera (or plasma) collected at different time points from another experiment to stain HEK293-ARTC2.2 or HEK293-P2X7 cell lines expressing high and stable levels of surface ARTC2.2 or P2X7, obtained by retroviral transduction of the parental HEK-293 cell line (Supplemental Figure 2). The data confirm that 7E2-IgG2a hcAb and s-14-IgG2a hcAb are detectable in the circulation at the earlier time point studied (*i.e.*, at day 13 post rAAV8 *i.m.* injection), are produced in all animals that were studied at a rather similar level, and slowly accumulate to reach a maximum concentration between 45 and 66 days post rAAV8 injection and remains stable thereafter (Supplemental Figure 2).

We next analyzed the level of target cell depletion overtime induced by the production of ARTC2.2-specific or P2X7-specific hcAb *in vivo*. Results obtained with the P2X7-specific 7E2-IgG2a hcAb showed a modest depletion of Treg, reaching 18 ± 4% at day 25 post rAAV injection. The proportions of CD4⁺CD25⁻ Tconv and CD8⁺ T cells were only slightly decreased in mice producing 7E2-IgG2a hcAb, consistent with lower levels of P2X7 on these subsets (Figures 6A–C). In contrast, in mice producing

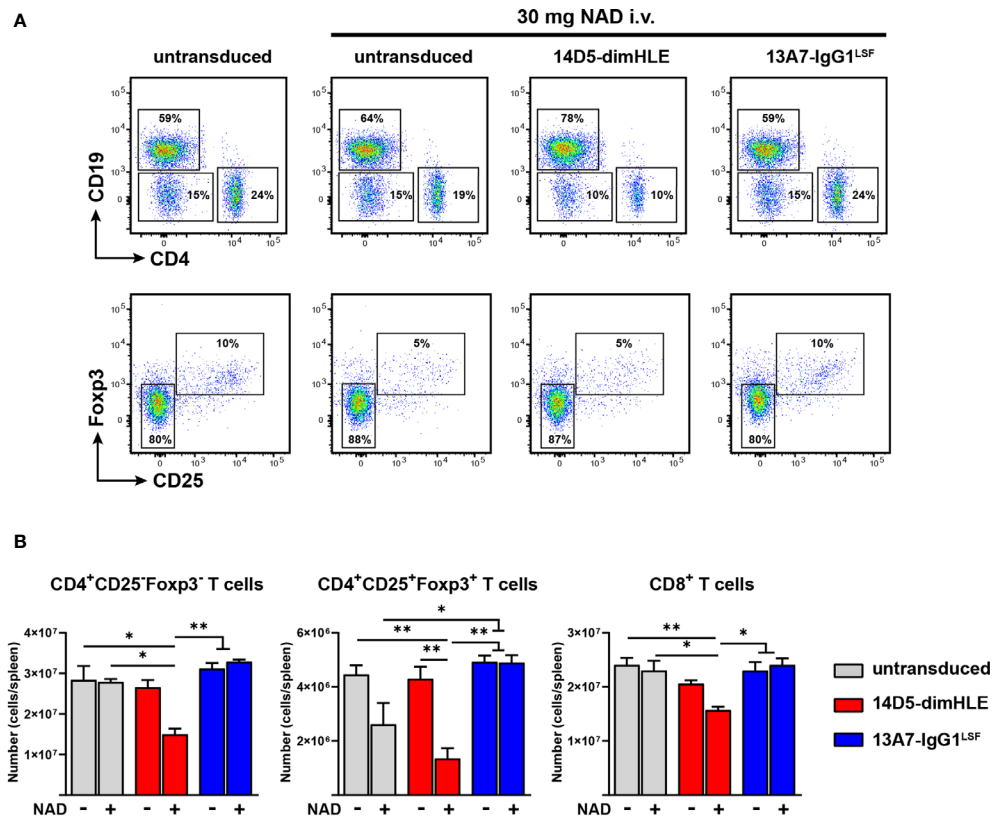


FIGURE 5 | AAVnano modulate *in vivo* the sensitivity to NAD⁺-induced cell death. C57BL/6 mice were injected i.m. with PBS (control) or with rAAV1 encoding the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE construct or the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb construct. 28 days later mice were injected i.v. with PBS or 30 mg NAD⁺. Splenocytes were collected one day after and analyzed by flow cytometry to evaluate the levels of P2X7-dependent T cell depletion induced by NAD⁺ injection. **(A)** Representative flow cytometry plots showing the relative percentages of cells in each group. In the upper panels, CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ lymphocytes were concatenated in the same subpopulation and analyzed together to visualize the level of depletion of CD4⁺ and CD8⁺ (CD4⁺/CD19⁺) T cells as compared to NAD⁺-insensitive CD19⁺ B cells. In the lower panels, the gated CD4⁺ cells were analyzed for both, expression of Foxp3 and CD25 to evaluate the percentages of Treg depletion in each group. Numbers indicate the percentage of cells in each indicated gate. **(B)** Absolute numbers of cells collected from spleen of untransduced control mice (grey) or from mice injected with rAAV encoding 14D5-dimHLE (red) or for 13A7-IgG1^{LSF} hcAb (blue). Each group was injected i.v. either with PBS (-) or with 30 mg of NAD⁺ (+). Error bars represent the SEM. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA (n=3 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01). Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to BV510), CD4 (APC-Cy7), CD8 (BV605), CD19 (PerCP-Cy5.5), CD25 (PE) and FoxP3 (BV421).

ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb, we found a substantial depletion of the three T cell subsets analyzed. Depletion was most pronounced for CD8⁺ that express the highest level of ARTC2.2. This construct was indeed found to deplete 85 ± 3% of CD8⁺ T cells, 65 ± 6% of Tconv, and 66 ± 5% of Treg 25 days post rAAV8 injection. The level of depletion was slightly higher at day 82 post rAAV8 injection (**Figure 6C**). For comparison, CD19⁺ B cells (that do not express P2X7 nor ARTC2.2) and myeloid non-granulocytic CD11b⁺ cells (that do express very little, if any, ARTC2.2 and low level of P2X7) were also enumerated in the blood at the same time point. Data demonstrated the absence of depletion of these subsets in agreement with their absence of expression or low expression of ARTC2.2 and/or P2X7 (**Supplemental Figure 3**). These findings illustrate the long-term and stable depleting effects of the target T cells elicited by these IgG2a hcAb upon a single i.m. injection of the corresponding hcAb-encoding rAAV8.

DISCUSSION

Surface expression of the ectoenzyme ARTC2.2 is restricted to T cells and is found at higher levels on murine CD8⁺ T cells as compared to CD4⁺CD25⁺ Treg or CD4⁺CD25⁻ Tconv (**Figure 1A**) (9). P2X7 is expressed by multiple cells, including immune cells of the myeloid and lymphoid compartments. On murine T cells, P2X7 is differentially expressed on T cell subsets, and was found to be expressed at higher levels on NKT cells, Treg, Tfh, and T_{RM} (12, 14–18). The homotrimeric P2X7 receptor is known to form an ATP-gated ion-channel connected to multiple signaling pathways that regulate cell phenotype, functions, differentiation and survival (11). For murine T cells, P2X7 activation can be triggered by two complementary pathways. As in myeloid and non-immune cells, the P2X7 receptor can be gated by the presence of relatively high concentrations of extracellular ATP (*i.e.*, 30 to

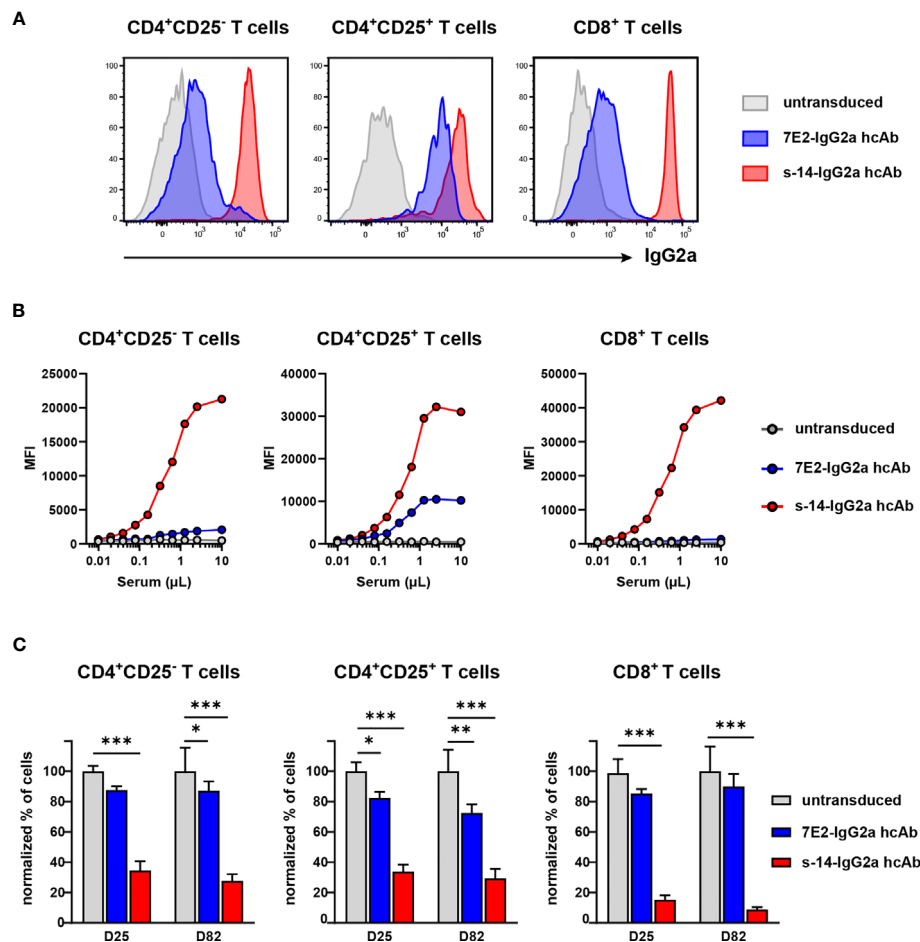


FIGURE 6 | AAVnano encoding nanobody-based IgG2a hcAb mediate depletion of cells expressing high levels of P2X7 or ARTC2.2. C57BL/6 mice were injected with PBS (untransduced, grey) or with rAAV8 encoding 7E2-IgG2a (blue) or s-14-IgG2a (red) hcAb. **(A, B)** Sera were collected 63 days post rAAV8 i.m. injection. To monitor the levels of hcAb in serum, splenocytes from an untreated naive C57BL/6 mouse were incubated with diluted sera, washed and bound hcAb were detected with an IgG2a-specific secondary antibody. **(A)** Flow cytometry analyses illustrating the binding of each nanobody-based IgG2a hcAb on the indicated subset of splenic cells from an untreated mouse when using 10 μ L of pooled sera collected from rAAV injected mice. **(B)** Splenocytes from an untreated mouse were incubated with serial dilutions of sera to titrate the relative abundance of the two hcAb. For both hcAb, serum volumes between 1–10 μ L were enough to saturate the signal. **(C)** To evaluate depletion of T cell subsets *in vivo*, blood samples were collected 25 days and 82 days after i.m. injection of rAAV encoding the indicated IgG2a hcAb. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry. Normalized percentage of CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺ T cells are shown, as compared to the percentages of cells found in the control group taken as 100%. Staining was performed using fluorochrome conjugated antibodies specific to CD45 (coupled to PerCP-Cy5.5), CD4 (APC-Cy7), CD8 (PE-Cy7), CD25 (PE) and biotinylated antibody to mouse IgG2a and streptavidin-APC. Errors bars represent the SEM and statistical analyses were performed using one-way ANOVA ($n=7$ in each group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

300 μ M range) that can be released from dying or stressed cells. In addition, in murine T cells, extracellular NAD⁺ was found to trigger activation of the P2X7 receptor at low micromolar concentrations (12, 24). The mechanism involves the ARTC2.2 catalyzed covalent ADP-ribosylation of P2X7 on R125 in the vicinity of the ATP-binding site (23). Although much was learnt during the last years on the multifaceted P2X7 receptor, the relative contribution of the ATP and NAD⁺ pathways their activation *in vivo*, their precise immunoregulatory roles, and their contribution in pathophysiological conditions, remain to be better addressed and studied. The AAVnano approach described here uses rAAV for durable production of nanobody-containing

biologics *in vivo*. This could be used in future studies to better delineate ARTC2.2 and/or P2X7 functions in animal models of acute as well as chronic diseases.

Our results show that a single injection of rAAV1 or rAAV8 encoding P2X7-specific or ARTC2.2-specific nanobody-based constructs (**Figure 1**) can inhibit or in contrast potentiate ATP- or NAD⁺-induced activation of P2X7 *ex vivo* on splenic T cells harvested from these mice. As one hallmark associated with P2X7 receptor activation, we used a sensitive *ex vivo* assay based on metalloprotease-dependent shedding of CD27 and CD62L from the T cell surface. Our data demonstrate that a single injection of a rAAV encoding the P2X7-blocking 13A7-

IgG1^{LSF} hcAb protects T cells from NAD⁺- as well as ATP-induced CD27 and CD62L shedding (**Figure 3B**). Similarly, injection of a rAAV encoding the ARTC2.2-blocking s+16a-dimHLE completely inhibits NAD⁺- but not ATP-induced shedding of CD27 and CD62L (**Figure 3B**). Remarkably, the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE sensitized T cells to NAD⁺- as well as ATP-induced shedding of CD27 and CD62L. This is noticeable also for Tconv and CD8⁺ T cells that express low levels of P2X7 and are therefore less sensitive to activation of P2X7 than Treg (**Figure 3B**).

Analysis of vascular and tissue resident liver T cells from mice sacrificed 120 days after injection of AAVnano revealed full occupancy of ARTC2.2 by s+16a-dimHLE on CD4⁺ T cells in the vasculature and liver parenchyma (**Figures 4B, C** and data not shown). Moreover, the high recovery of CD69⁺ T_{RM} indicates that this cell population is fully protected from NAD-induced cell death (NICD) during cell preparation in these mice (**Figure 4B**). Much lower numbers of NKT cells and CD69⁺ T_{RM} (*i.e.*, the cell populations with the highest cell surface levels of P2X7) were recovered from mice injected with the rAAV1 encoding 14D5-dimHLE, consistent with its P2X7-potentiating activity that might enhance cell death *in vivo* and/or during cell preparation. High numbers of liver T_{RM} were recovered from mice expressing *in vivo* the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb, consistent with its protective role on NICD. The low staining of these cells with the IgG1-specific secondary Ab, possibly reflects hcAb induced endocytosis of P2X7 by these cells.

We next evaluated directly *in vivo* the potential of these endogenously produced constructs to modulate P2X7 receptor activation. We previously reported that a single i.v. injection of 60 mg NAD⁺ depletes about 80% of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg following ARTC2.2-dependent activation of P2X7 (24). We injected here a lower dose of 30 mg NAD⁺ to better evaluate the potentiating effect of 14D5-dimHLE. The results indeed demonstrate that this dose depletes 41 ± 18% of the Treg cells in untransduced control mice, while 68 ± 9% Treg cells are depleted by the same treatment in animals whose muscle cells had been transduced with rAAV1 coding for 14D5-dimHLE (**Figure 5B**). Even the less sensitive Tconv and CD8⁺ T cells, which were not affected by 30 mg NAD⁺ in untransduced mice, were significantly depleted in animals expressing 14D5-dimHLE (although to a lesser degree than Treg). These results are consistent with the data obtained *ex vivo*, that 14D5-dimHLE potentiates P2X7 function also in T cell subsets that display lower P2X7 surface expression. Taken together, these data demonstrate that the AAVnano approach described here is a feasible approach to reproducibly modulate ARTC2.2 or P2X7 functional activities *in vivo*.

Several small molecules P2X7 blockers have been developed by pharmaceutical and biotechnology companies in the past years since P2X7 is a potential target in inflammatory diseases and in cancer (37–41). Several studies have indeed evidenced that pharmacological blockade of P2X7 is associated with therapeutic benefits in pre-clinical animal models of inflammation, pain, autoimmune and neurodegenerative diseases, and cancer.

Given that many cancer cells express high levels of P2X7 receptors (notably mutated, truncated, or splice variants that are not able to trigger P2X7-dependent cell death), and that its tonic activation in the tumor microenvironment is associated with tumor proliferation and invasiveness, P2X7-blockade was envisioned as a possible cancer therapy. This was demonstrated in several animal studies (42, 43). Using our AAVnano approach, coding for the P2X7-blocking 13A7-IgG1^{LSF} hcAb, we recently reported a similar finding (44). This suggests that the AAVnano methodological approach, in addition to knock-out models and small molecule inhibitors, represents an alternative and complementary possibility to validate *in vivo* the importance of P2X7 target in various animal models.

In addition to P2X7-blockers, some compounds were recently identified as positive allosteric modulators of P2X7 activation (45–47). As for the 14D5-dimHLE biologics described here, these molecules offer the interesting perspective to potentiate P2X7 only in the microenvironment *in vivo* where NAD⁺ and/or ATP are present in the extracellular space in sufficient quantities to trigger P2X7-gating, as for instance in the tumor microenvironment (48). One such small-molecule positive allosteric modulator of P2X7, named HEI3090, has recently shown promising results in mouse models of non-small cell lung cancer and melanoma (49). Interestingly, the mechanism involves the stimulation of immune cells (*i.e.*, dendritic cells, NK cells, and CD4⁺ effector T cells), and production of IL-18. This finding underscores the notion that P2X7 stimulation may indeed be beneficial in certain circumstances. Since both, blocking or potentiating P2X7 seems to be beneficial in some cancer models, the AAVnano approach described here, allowing both modalities to be studied using the same approach, might be used in future studies as a tool to extend our knowledge on the positive and negative functions of P2X7 in different disease models.

Another potential application that we explored here is the development and use of nanobody-based hcAb to promote cell depletion *in vivo*. We exploited the natural ability of Fc-region to bind to FcR on immune cells and to mediate Fc-related effector functions and/or to induce the activation of the classical complement pathway. For that, we fused P2X7-specific or ARTC2.2-specific nanobodies to the hinge and Fc region of mouse IgG2a to generate nanobody-based hcAb. We then evaluated the capacity of these biologics to mediate the depletion of target-expressing cells *in vivo* following i.m. injection of rAAV8 that encode these constructs. In line with the cell surface levels of ARTC2.2 and P2X7 on T cell subsets, our results revealed that the ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb mediated considerably higher cell depletion than the P2X7-specific 7E2-IgG2a hcAb (**Figure 6C**). Also, when considering each construct individually, the relative level of cell depletion of each T cell subset was found to correlate with the relative abundance of the target protein at the cell surface. Thus, the ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb depleted the CD8⁺ subset more efficiently than the other two subsets (**Figures 6A, B**). Similarly, although at lower levels, the P2X7-specific 7E2-IgG2a

hcAb depleted Treg more efficiently than the other two subsets (**Figures 6A–C**). Hence, cell depletion appeared in our models to depend on the level of the target antigen at the surface of each T cell subset. Higher target antigen levels might indeed promote higher FcγR cross-linking on the surface of effector cells, as well as a higher propensity to bind C1q and to activate the complement cascade. However, we cannot exclude that other factors may contribute to the differences observed in the level of depletion with these two hcAb. Factors such as the location of the epitope recognized by the nanobody, the lateral mobility of the target protein at the cell surface (*i.e.*, ARTC2.2 is GPI-anchored protein while P2X7 is a two-transmembrane domain protein), its degree of oligomerization (ARTC2.2 is a monomer while P2X7 forms a homotrimeric ion channel), may also influence the level of cell depletion. Nonetheless, high levels of cell depletion that reached up to 85% of CD8⁺ cells were reproducibly obtained *in vivo* using the rAAV coding the ARTC2.2-specific s-14-IgG2a hcAb and this level of depletion was remarkably maintained throughout the study until the latest time point studied (**Figure 6C**). We propose that this strategy may be used to deplete cells that express the highest levels of ARTC2.2 *in vivo* and provides a tool for studying the NAD⁺/ARTC2.2 signaling pathways. In parallel, increasing the depleting efficiency of P2X7-specific hcAb may also be of interest for translational preclinical cancer studies. As mentioned earlier, P2X7 is expressed at the surface of many cancer cells. Depleting P2X7-specific hcAb may thus be used directly to eliminate tumor cells and additionally to deplete Treg (*i.e.*, T cells expressing higher levels of P2X7) potentially resulting in the induction of two synergistic anti-tumor mechanisms.

In this proof-of-principle study, we illustrated the potential of two methodological approaches to study ARTC2.2 and P2X7 function in animal model using rAAV. The aim of AAVnano is to bypass the need to produce and characterize recombinant proteins *in vitro*, to avoid protein injections every 1–2 days, and to favor a stable concentration and bioavailability. We demonstrate that a single i.m. injection of a rAAV encoding a nanobody-based biologic was sufficient to elicit long-term modulation of ARTC2.2 or P2X7 activity, or depletion of the cells expressing these proteins at high cell density. We propose that the AAVnano methodology may be used in future studies for further evaluating the role of ARTC2.2 and/or P2X7 in animal models of various diseases where these proteins have been implicated.

Although this methodological approach have many advantages, including the possibility to explore in parallel potential long-term side effects *in vivo* (*i.e.*, on-target long-term effects as well as off-target effects), AAVnano have also some limitations. Considering the potential long-term side effects, animals remained healthy in our studies during the entire observation period (until day 120) and we did not observed any conspicuous signs of disease or side effects. We cannot however ruled-out that the biologics that were evaluated here induce other effects that we did not fully explored. The P2X7-specific hcAb that we evaluated here may for instance deplete or influence other cells than the studied T cells as for instance

myeloid cells or microglial cells known to also express P2X7. Even if we did not notice any significant depletion of CD11b⁺ myeloid cells in blood during our analyses (**Supplemental Figure 3**), more detailed investigations will be required in future studies to evaluate this possibility, notably in tissue-resident cells as well as in diseased animal models. Apart from unanticipated side effects, one obvious limitation of our AAVnano approach is the difficulty to evaluate the candidate nanobody-based biologics in therapeutic schemes. Indeed, AAV-based transgenic expression *in vivo* usually require 10 to 14 days before the biologics can be significantly produced and detected in the circulation. This period can however be reduced to 2 to 4 days using a “self-complementary” (sc) transgene instead of the “single-stranded” (ss) transgene packaged in classical rAAV vectors. Production and use of scAAV may represent therefore an interesting alternative to the ssAAV used in this study when rapid production of the biologics is required (as in therapeutic protocols or for treating tumors). Hence, AAVnano represents at least a method of choice in chronic situations and as a first *in vivo* approach to evaluate efficacy and absence of long-term side effects before evaluation of the corresponding selected recombinant biologics in therapeutic and translational models.

Interestingly, the rAAV encoding P2X7-specific constructs described here represent to our knowledge the first tools that can be used *in vivo* to either inhibit or potentiate the P2X7 receptor durably, offering the possibility of evaluating the role of P2X7 in various pathophysiological animal models. This methodical approach may be particularly promising for the reevaluation of the role of P2X7 in cancer as well as in inflammatory and neurodegenerative diseases where conflicting results have been obtained so far using knock-out models and/or repetitive administration of small-molecule inhibitors.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité d’Ethique NORMandie en Matière d’EXpérimentation Animale (CENOMEXA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FK-N and SA, conceptualization. HG, MD, RH, AS, MJ, CP-E, FK-N, and SA, methodology. HG, MD, RH, AS, MJ, CP-E, and SA, investigation. HG, FK-N, and SA, writing – original draft. HG, MD, RH, AS, FK-N, OB, and SA, writing – review and

editing. FK-N and SA, funding acquisition. RV, OB, FK-N, and SA, resources. FK-N and SA, supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to FK-N (No310/13, No310/14, and SFB1192-B5), by a stipend from the Werner-Otto

Foundation to MJ, and by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) to SA (ANR-18-CE92-0046).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.704408/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Koch-Nolte F, Haag F, Guse AH, Lund F, Ziegler M. Emerging Roles of NAD⁺ and its Metabolites in Cell Signaling. *Sci Signal* (2009) 2:mr1. doi: 10.1126/scisignal.257mr1
- Linden J, Koch-Nolte F, Dahl G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol* (2019) 37:325–47. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052406
- Adriouch S, Haag F, Boyer O, Seman M, Koch-Nolte F. Extracellular NAD⁺: A Danger Signal Hinder Regulatory T Cells. *Microbes Infect* (2012) 14:1284–92. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.011
- Koch-Nolte F, Kernstock S, Mueller-Dieckmann C, Weiss MS, Haag F. Mammalian ADP-Ribosyltransferases and ADP-Ribosylhydrolases. *Front Biosci* (2008) 13:6716–29. doi: 10.2741/3184
- Bazan JF, Koch-Nolte F. Sequence and Structural Links Between Distant ADP-Ribosyltransferase Families. *Adv Exp Med Biol* (1997) 419:99–107. doi: 10.1007/978-1-4419-8632-0_12
- Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kühl M, Reche P, et al. The Family of Toxin-Related Ecto-ADP-Ribosyltransferases in Humans and the Mouse. *Protein Sci* (2009) 11:1657–70. doi: 10.1110/ps.0200602
- Koch-Nolte F, Petersen D, Balasubramanian S, Haag F, Kahlke D, Willer T, et al. Mouse T Cell Membrane Proteins Rt6-1 and Rt6-2 are Arginine/Protein Mono(ADPribose)transferases and Share Secondary Structure Motifs With ADP-Ribosylating Bacterial Toxins. *J Biol Chem* (1996) 271:7686–93. doi: 10.1074/jbc.271.13.7686
- Hong S, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, Dubyak GR. Basal and Inducible Expression of the Thiol-Sensitive ART2.1 Ecto-ADP-Ribosyltransferase in Myeloid and Lymphoid Leukocytes. *Purinergic Signal* (2009) 5:369–83. doi: 10.1007/s11302-009-9162-2
- Koch-Nolte F, Duffy T, Nissen M, Kahl S, Killeen N, Ablamunits V, et al. A New Monoclonal Antibody Detects a Developmentally Regulated Mouse Ecto-ADP-Ribosyltransferase on T Cells: Subset Distribution, Inbred Strain Variation, and Modulation Upon T Cell Activation. *J Immunol* (1999) 163:6014–22.
- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, et al. ADP-Ribosylation at R125 Gates the P2X7 Ion Channel by Presenting a Covalent Ligand to its Nucleotide Binding Site. *FASEB J* (2008) 22:861–9. doi: 10.1096/fj.07-9294com
- Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* (2015) 6:204. doi: 10.3389/fimmu.2015.00204
- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, et al. NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor. *Immunity* (2003) 19:571–82. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00266-8
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, et al. NAD⁺ and ATP Released From Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells. *J Immunol* (2009) 182:2898–908. doi: 10.4049/jimmunol.0801711
- Rissiek B, Danquah W, Haag F, Koch-Nolte F. Technical Advance: A New Cell Preparation Strategy That Greatly Improves the Yield of Vital and Functional Tregs and NKT Cells. *J Leukocyte Biol* (2014) 95:543–9. doi: 10.1189/jlb.0713407
- Stark R, Wesselink TH, Behr FM, Kragten NAM, Arens R, Koch-Nolte F, et al. TRM Maintenance is Regulated by Tissue Damage via P2RX7. *Sci Immunol* (2018) 3. doi: 10.1126/sciimmunol.aau1022
- Borges da Silva H, Wang H, Qian LJ, Hogquist KA, Jameson SC. ARTC2.2/P2RX7 Signaling During Cell Isolation Distorts Function and Quantification of Tissue-Resident CD8⁺ T Cell and Invariant NKT Subsets. *Ji* (2019) 202:2153–63. doi: 10.4049/jimmunol.1801613
- Georgiev H, Ravens I, Papadogianni G, Malissen B, Förster R, Bernhardt G. Blocking the ART2.2/P2X7-System Is Essential to Avoid a Detrimental Bias in Functional CD4 T Cell Studies. *Eur J Immunol* (2018) 48:1078–81. doi: 10.1002/eji.201747420
- Rissiek B, Lukowiak M, Raczkowski F, Magnus T, Mittrücker H-W, Koch-Nolte F. *In Vivo* Blockade of Murine ARTC2.2 During Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol* (2018) 9:1580. doi: 10.3389/fimmu.2018.01580
- Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu Rev Biochem* (2013) 82:775–97. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, et al. Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity. *Med Microbiol Immunol* (2009) 198:157–74. doi: 10.1007/s00430-009-0116-7
- Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL. Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:695–715. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053327
- De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular Basis for the Preferential Cleft Recognition by Dromedary Heavy-Chain Antibodies. *Proc Natl Acad Sci* (2006) 103:4586–91. doi: 10.1073/pnas.0505379103
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schöffow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, et al. Single Domain Antibodies From Llama Effectively and Specifically Block T Cell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 *In Vivo*. *FASEB J* (2007) 21:3490–8. doi: 10.1096/fj.07-8661com
- Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, et al. Extracellular NAD⁺ Shapes the Foxp3⁺ Regulatory T Cell Compartment Through the ART2–P2X7 Pathway. *J Exp Med* (2010) 207:2561–8. doi: 10.1084/jem.20091154
- Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, et al. Nanobodies That Block Gating of the P2X7 Ion Channel Ameliorate Inflammation. *Sci Transl Med* (2016) 8:366ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8463
- Koch-Nolte F, Eichhoff A, Pinto-Espinoza C, Schwarz N, Schäfer T, Menzel S, et al. Novel Biologics Targeting the P2X7 Ion Channel. *Curr Opin Pharmacol* (2019) 47:110–8. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.001
- Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, et al. Re-Evaluation of Neuronal P2X7 Expression Using Novel Mouse Models and a P2X7-Specific Nanobody. *eLife* (2018) 7:e36217. doi: 10.7554/eLife.36217
- Saunders KO. Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. *Front Immunol* (2019) 10:1296. doi: 10.3389/fimmu.2019.01296
- Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Stigter-van Walsum M, Dreier T, de Haard HJ, et al. Improved Tumor Targeting of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobodies Through Albumin Binding: Taking Advantage of Modular Nanobody Technology. *Mol Cancer Ther* (2008) 7:2288–97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2384

30. Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, et al. Increasing the Serum Persistence of an IgG Fragment by Random Mutagenesis. *Nat Biotechnol* (1997) 15:637–40. doi: 10.1038/nbt0797-637
31. Chen H. Manufacturing of Adeno-Associated Viruses, for Example: AAV2. *Methods Mol Biol* (2011) 737:235–46. doi: 10.1007/978-1-61779-095-9_10
32. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-Based Protection Against HIV Infection by Vectored Immunoprophylaxis. *Nature* (2011) 481:81–4. doi: 10.1038/nature10660
33. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science* (2005) 310:1510–2. doi: 10.1126/science.1118948
34. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, et al. Intravascular Staining for Discrimination of Vascular and Tissue Leukocytes. *Nat Protoc* (2014) 9:209–22. doi: 10.1038/nprot.2014.005
35. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity* (2014) 41:886–97. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.007
36. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-Resident Memory T Cells: Local Specialists in Immune Defence. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:79–89. doi: 10.1038/nri.2015.3
37. Jacobson KA, Müller CE. Medicinal Chemistry of Adenosine, P2Y and P2X Receptors. *Neuropharmacology* (2016) 104:31–49. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.001
38. Burnstock G, Knight GE. The Potential of P2X7 Receptors as a Therapeutic Target, Including Inflammation and Tumour Progression. *Purinergic Signal* (2018) 14:1–18. doi: 10.1007/s11302-017-9593-0
39. Sluyter R. The P2X7 Receptor. *Adv Exp Med Biol* (2017) 1051:17–53. doi: 10.1007/5584_2017_59
40. De Marchi E, Orioli E, Dal Ben D, Adinolfi E. P2X7 Receptor as a Therapeutic Target. *Adv Protein Chem Struct Biol* (2016) 104:39–79. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.11.004
41. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment. *Nat Rev Cancer* (2018) 18:601–18. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0
42. De Marchi E, Orioli E, Pegoraro A, Sangalietti S, Portararo P, Curti A, et al. The P2X7 Receptor Modulates Immune Cells Infiltration, Ectonucleotidases Expression and Extracellular ATP Levels in the Tumor Microenvironment. *Oncogene* (2019) 38:3636–50. doi: 10.1038/s41388-019-0684-y
43. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 Receptor Increases *In Vivo* Tumor Growth. *Cancer Res* (2012) 72:2957–69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1947
44. Demeules M, Scarpitta A, Abad C, Gondé H, Hardet R, Pinto-Espinoza C, et al. Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front Oncol* (2020) 10:1699. doi: 10.3389/fonc.2020.01699
45. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R. The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacol Rev* (2014) 66:638–75. doi: 10.1124/pr.113.008003
46. Di Virgilio F, Giuliani AL, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Sarti AC. Non-Nucleotide Agonists Triggering P2X7 Receptor Activation and Pore Formation. *Front Pharmacol* (2018) 9:39. doi: 10.3389/fphar.2018.00039
47. Stokes L, Bidula S, Bibič L, Allum E. To Inhibit or Enhance? Is There a Benefit to Positive Allosteric Modulation of P2X Receptors? *Front Pharmacol* (2020) 11:627. doi: 10.3389/fphar.2020.00627
48. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* (2017) 47:15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020
49. Douguet L, Janho D, Hreich S, Benzaquen J, Seguin L, Juhel T, Dezitter X, et al. A Small-Molecule P2RX7 Activator Promotes Anti-Tumor Immune Responses and Sensitizes Lung Tumor to Immunotherapy. *Nat Commun* (2021) 12:653. doi: 10.1038/s41467-021-20912-2

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gondé, Demeules, Hardet, Scarpitta, Junge, Pinto-Espinoza, Varin, Koch-Nolte, Boyer and Adriouch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publication

Mélanie Demeules, Allan Scarpitta, Romain Hardet, Henri Gondé, Catalina Abad, Frederich Koch-Nolte, Sahil Adriouch

Contexte de l'étude. L'ATP a un rôle complexe sur la croissance tumorale. L'ATP peut favoriser la croissance tumorale mais aussi les réponses immunitaires antitumorales principalement *via* le récepteur P2X7. Ce récepteur a suscité un intérêt croissant dans le domaine du cancer. P2X7 est exprimé par les cellules immunitaires et par la plupart des cellules tumorales malignes où il joue un rôle crucial mais complexe qui reste à élucider.

Méthode. Pour étudier le rôle de P2X7 dans le cadre du cancer, nous avons utilisé la méthodologie rAAVnano modulateurs de P2X7 seul ou en combinaison avec des chimiothérapies ou des AAVnano ciblant PD-L1 ou CD73 un autre acteur de la signalisation purinergique. Les AAVnano sont injectés trois semaines avant les cellules tumorales, et la chimiothérapie en une seule injection une semaine après.

Principaux résultats.

- Bloquer P2X7 avec le rAAVnano 13A7-hcAb permet de ralentir la croissance tumorale et confère une meilleure survie aux animaux quand la tumeur exprime P2X7.
- Potentialiser P2X7 avec le rAAVnano 14D5-dimHLE n'a pas d'effet seul sur la croissance tumorale.
- Les nanobodies antagonistes et potentialisateurs de P2X7 modifient les proportions de cellules immunitaires infiltrant la tumeur par rapport aux souris témoins.
- 14D5-dimHLE diminue la proportion des lymphocytes T CD4⁺, et augmente la proportion de cellules proinflammatoires telles que les lymphocytes T CD8⁺ et de macrophages de type 1.
- La potentialisation du récepteur P2X7 en combinaison avec l'oxaliplatine, une chimiothérapie entraînant une mort immunogénique, permet de diminuer le volume tumoral et entraîne une régression tumorale pour certaines souris ainsi qu'une augmentation de la survie en améliorant les réponses immunitaires spécifiques de la tumeur.
- La combinaison de la potentialisation de P2X7 avec un nanobodies anti-PD-L1 permet de réduire le volume tumoral et une meilleure survie des animaux.
- Les constructions bispécifiques CD73/PD-L1 ont un effet plus important sur le volume tumoral et la survie des souris dans deux modèles tumoraux expérimentaux.

Evaluation of nanobody-based biologics targeting P2X7 or targeting key players of the purinergic signalling pathway in tumor models in vivo

Mélanie Demeules¹, Allan Scarpitta¹, Romain Hardet¹, Henri Gondé¹, Catalina Abad¹, Frederich Koch-Nolte² and Sahil Adriouch¹

¹Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular diseases and regenerative THERapies (PANTHER), 76000, Rouen, France.

²Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

Abstract

Adenosine triphosphate (ATP) represents a danger signal that accumulates in injured tissues, in inflammatory sites, and in the tumor microenvironment. ATP promotes tumor growth but also immune eradicating responses mainly via the P2X7 receptor. This receptor has attracted increasing interest in the field of cancer. P2X7 is expressed by immune cells and by most malignant tumor cells where it plays a crucial yet complex role that remains to be clarified. Here, we investigated the role of P2X7 by using the AAVnano methodological approach in several tumor models, whereby AAV-mediated gene transfer is used to expressed nanobody-based biologics in vivo targeting P2X7. Blocking P2X7 when the tumor expressed this receptor inhibits tumor growth and improved mice survival. To evaluate if P2X7 stimulation could also promote anti-tumor immune responses, another nanobody-based biologics was used to potentiate P2X7 function in vivo and evaluated in combination with other anti-tumor treatment. The results demonstrated that P2X7-potentialisation, in combination with an immunogenic chemotherapy, or in combination with antagonistic anti-PD-L1 nanobody, enhanced immune responses against the tumor and reduced tumor volume. Finally, using the same methodological approach, we also evaluated for the first time, a bi-specific nanobody-based biologics not only targeting PD-L1 but also inhibiting the ecto-5'-ectonucleotidase CD73. CD73 is another key player of the purinergic signaling in the tumor microenvironment that play an essential role in the generation of immunosuppressive adenosine. This novel nanobody-based biologics was found to exert a potent anti-tumor effect, promoting tumor rejection and improving mice survival in two tumor models. Hence, this study highlight the importance of the purinergic signaling in tumor progression or tumor regression and open new avenues in the generation of nanobody-based biologics that may be further exploited in the treatment of tumors.

Introduction

Adenosine triphosphate (ATP) release into the extracellular space (eATP) represents a well-known danger signal acting through two main families of plasma membrane receptors: G protein-coupled receptors, named P2Y receptors, and ATP-gated ion channels, termed P2X receptors (Geoffrey Burnstock 2006). Among the latter family, P2X7 forms a homotrimeric receptor that has attracted much interest in the fields of inflammation and cancer. P2X7, a non-selective ligand gated cation channel, is expressed at the cell surface of various leukocytes, in particular monocytes, macrophages and regulatory T cells (Bartlett, Stokes, and Sluyter 2014; Francesco Di Virgilio et al. 2017). P2X7 is known to be central in inflammation for its ability to activate the NLRP3 inflammasome and trigger IL-1 β and IL-18 release (Adinolfi et al. 2018; Orioli et al. 2017). Prolonged activation of P2X7 leads to the opening of a membrane pore allowing the entry of large molecules of up to 900 Da. Whether this membrane permeabilization is due to dilatation of the P2X7 channel itself or to the activation of non-selective pores like pannexin-1, gasdermin-D or anoctamin-6, may depend on the cellular context, the lipid composition of the membrane, and on the level of expression of these proteins (Francesco Di Virgilio, Schmalzing, and Markwardt 2018; Francesco Di Virgilio, Giuliani, et al. 2018; Peverini et al. 2018). Whatever the precise molecular mechanism leading to pore formation, P2X7 can lead to major perturbation of intracellular ion balance and to modification of cellular activities, cellular function, and cell fate. In the context of cancer, P2X7 has been assigned various and contrasting roles as a driver of cancer cell growth (Francesco Di Virgilio, Clara Sarti, Falzoni, De Marchi, and Adinolfi 2018) and metastatic dissemination, or as a promoter of immune mediated tumor eradication (Adinolfi et al. 2015; 2019). High concentrations of extracellular ATP (eATP), released in the vicinity of stressed or damaged cells, during inflammation, but also within the tumor site, represent a “danger signal” than can influence the activity and function of immune cells. P2X7 is also found at the surface of numerous tumor cell types and as been proposed to confer a selective advantage to tumor cells through their tonic stimulation, leading to higher concentration of mitochondrial calcium, fueling growth and invasiveness (Adinolfi et al. 2005; Adinolfi, Cirillo, Woltersdorf, Falzoni, Chiozzi, Pellegatti, Callegari, Sandonà, Markwardt, Schmalzing, and Di Virgilio 2010). Extracellular ATP plays a complex role within the tumor microenvironment (TME) depending on multiple factors such as its concentration, the abundance of ecto-ATPases, the expression level of P2X7, and the nature of the P2X7 variant expressed by immune and tumor cells (C. N. J. Young and Górecki 2018).

On T lymphocytes, P2X7 induces the shedding of CD62L and CD27 by metalloproteases (Rissiek et al. 2015; Sommer et al. 2016), and controls the differentiation, proliferation and survival of tissue resident memory T cells (Stark et al. 2018; Rissiek et al. 2018). Also, FoxP3⁺ regulatory T cells (Tregs) are known to express P2X7 at high levels, and its activation control their phenotype, their suppressive functions, as well as their survival (Rissiek et al. 2015; Hubert et al. 2010). Taken together, activation

of P2X7 on myeloid and lymphoid cells converge to promote and amplify inflammation and the emergence of an adaptive T cell response (Adinolfi et al. 2018; Francesco Di Virgilio et al. 2017).

In the tumor microenvironment (TME), P2X7 blockade induces modification in the expression of ecto-enzymes involved in the control of the purinergic signaling, including modifications in the expression of the 5'-ecto-nucleotidases CD73 that control accumulation of the immunosuppressive adenosine (De Marchi et al. 2019). This strongly suggests that P2X7 expression and function may control the entire eATP/adenosine balance in the TME and may exert a broad impact on tumor proliferation and dissemination. Yet, other studies also indicated a key role of the P2X7 in anti-tumor immunity and ATP release in the TME is considered as one of the key hallmarks of immunogenic cell death, leading to immune cells stimulation. Hence, P2X7 either on its own or in collaboration with other key player of the purinergic signaling cascade such as CD39 and CD73, play an important role in the immunogenicity of the tumor at least during the early phase of cancer development (Lara et al. 2020b; Mello, Coutinho-Silva, and Savio 2017). Antagonistic antibodies targeting CD39 that are in clinical development, exerts their therapeutic effect partly in relation with P2X7 (X.-Y. Li et al. 2019; J. Yan et al. 2020). Antibodies against CD73, that also holds promise in clinics, have been shown to improve anti-tumor immune responses and to prevent metastasis when used alone or in combination with other therapeutic strategies (B. Allard et al. 2017b). This suggest that targeting P2X7 and/or multiple key purinergic players in the TME, may have beneficial role to treat tumors. Here we used a AAVnano methodology approach, that we previously described (Demeules et al. 2020) to evaluate in vivo the anti-tumor effects of P2X7 blocking, or conversely P2X7 potentiation, in different tumor models. Further, we developed novel nanobody-based biologics targeting other key player of the tumor microenvironment and evaluate their efficacy either alone, or in combination with a P2X7 potentiating nanobody-based biologic. Interestingly, we demonstrated that a bi-specific construct targeting PD-L1 and CD73 exert a potent anti-tumor effect, promoting tumor rejection and improving mice survival in two tumor models. Hence, this study highlight the importance of the purinergic signaling in the tumor context and suggest that key purinergic players represent attractive novel anti-tumor checkpoints that may be further exploited in future treatments.

Materiel and methods

Mice, Reagents, Antibodies

C57BL/6 wild-type mice obtained from Janvier Labs were used for all experiments. Mice were housed in a specific pathogen-free facility and were aged of 8 weeks at the beginning of experiments. All animal experiments were approved by the local institutional ethic committee (n° 27682).

Adenosine 5'-tri-phosphate disodium salt (A2383) was purchased from sigma Aldrich. Red blood cell (RBC) lysis/fixation Solution, True-Nuclear Transcription factor buffer set, and antibodies CD45 (clone 30-F11), CD4 (RM'-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC-61), CD19 (1D3/CD19), FoxP3 (MF-14), CD27 (LG.3A10), CD62L (MEL-14), P2X7R (1F11), CD39 (Duha59), CD73 (CXCR3-176), TIGIT (1G9), TIM3 (RMT3-23), CD49b (DX5), NK1.1 (PK136), CX3CR1 (SAO11F11), PD1 (29F1A12), CD11c (N418), CD11b (M1170), CD44 (IM7), XCR1 (ZET) and purified CD16/D32 (TruStain FcX) were obtained from Biolegend or Sony Biotechnology.

Flow cytometry Analyses

For evaluation of P2X7 expression on tumor cells, tumor cells were collected, and single-cells suspensions were prepared and washed using standard procedures. Cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-P2X7 or related isotype controls.

For evaluation of P2X7-dependent shedding of CD27 and CD62L upon ex vivo exposure to ATP, blood samples were collected, washed, resuspend into PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺) and divided into 3 tubes. Cells were then treated with 30 μ M ATP, 150 μ M ATP or left untreated. After incubation for 15 min at 37°C, cells were washed in cold D-PBS containing 10% FBS and stained on ice with fluorochrome-conjugated antibodies before fixation and RBC lysis. The percentages of cells co-expressing CD27 and CD62L were then evaluated by flow cytometry.

For the evaluation of the cells infiltrating the tumor, the B16F10 tumor was excised, and the cell suspension was filtered through a 100 μ M filter. Single cell suspensions were prepared and washed using standard procedures. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies before fixation and RBC lysis. Cells were then evaluated by flow cytometry.

Flow cytometry data acquisitions were performed using an LSRFortessa or a FACSCanto-I (BD Biosciences) apparatus and subsequent analyses were performed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Production of rAAV and muscle transduction

For the production of rAAV, all constructs were cloned into a pFB plasmid under the control of a CBA promoter (for rAAV1 constructs encoding 14D5-dimHLE and 13A7-IgG1LSF) or under the related

CASI promoter (for rAAV8 constructs encoding PD-L1-dimHLE, CD73-dimHLE and CD73/PD-L1-dimHLE). Production, purification, and titration of rAAV1 and rAAV8 were performed by Virovek (Hayward, California, USA) using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells. For muscle transduction, mice hind legs were shaved under anesthesia and 100 μ L diluted rAAV were injected into 4 gastrocnemius or quadriceps muscle sites to reach a total dose of 10^{11} viral genomes (vg) per mouse.

Cell cultures

Mouse B16F10 (ATCC CRL-6375) melanoma cell line, mouse LLC (ATCC CRL-1642) Lewis Lung Carcinoma cell line and EG7 (ATCC CRL-2113) were tested for mycoplasma. B16F10 and LLC were grown in DMEM glutamax medium (Sigma-Aldrich), FBS 10%, penicillin (100 U/ml) streptomycin (100 mg/ml) and pyruvate 1mM all purchased from Gibco. EG7 were grown in RPMI medium (Sigma-Aldrich), FBS 10%, penicillin (100 U/ml) streptomycin (100 mg/ml) and pyruvate 1mM all purchased from Gibco.

Experiments in murine models

For muscle transduction, mice hind legs were shaved under anesthesia and 100 μ L diluted rAAV were injected into 4 gastrocnemius or quadriceps muscle sites to reach a total dose of 10^{11} viral genomes per mouse. 21 days, later B16-F10 (5×10^5), LLC (5×10^5) or EG7 (10^6) cells were subcutaneously injected into the right flank of each mouse. The animals were randomised, and the operator was blinded to the group of allocation. Tumors were measured with a calliper, and their volume calculated according to the following equation: $V = \text{length} \times \text{width} \times [(\text{length} + \text{width})/2]$. In some experiments, oxaliplatin was injected seven days after tumor inoculation at 5mg/kg.

Statistics

All data are shown as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical comparison between experimental groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical analyses of the mean tumor volume were performed using two-way ANOVA. Statistical analysis of the survival was performed using Log-Rank tests. All statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, Ca, USA). p-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results:

Injection of AAV vectors coding for nanobody-based biologics can be used to significantly block or potentiate P2X7 function in vivo

In this study, we used the AAVnano methodological approach (Demeules et al. 2020), to evaluate the anti-tumor effect of nanobody-based biologic designed to block or to potentiate P2X7 function. Thus, using this approach, a single intramuscular injection of the corresponding AAV, elicit in situ production of the modulating biologics over several weeks with a relatively stable pharmacokinetic profile allowing evaluation in vivo of the targeted pathway (**Fig. 1A**). We generated AAV vectors coding for a P2X7-antagonistic heavy chain antibody designated 13A7-hcAb (nanobody 13A7 fused to the hinge and Fc-region of a mouse IgG1) or a bivalent, half-life extended, P2X7-potentiating nanobody dimer designated 14D5-dimHLE (i.e. composed of dimer of the 14D5 nanobody fused to a third nanobody directed against albumin, thereby conferring half-life extension) (Danquah et al. 2016) (**Fig. 1B**). AAV1 vectors coding for these constructs were injected intramuscularly in the gastrocnemius of C57BL/6 mice, 21 days before tumor inoculation. To evaluate the functionality of the nanobody-based constructs produced in vivo, we collected blood sample before tumor inoculation in each of the following experiments, and evaluated the function of P2X7 at the surface of circulating peripheral blood leucocytes. For that, blood samples were incubated with different concentrations of ATP ex vivo and P2X7-dependant shedding of CD62L and CD27 were monitored on T cells. CD8⁺ T cells (**Fig. 1C**), CD4⁺ T cells (**Fig. 1D**) and CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells (**Fig. 1E**) from mice injected with AAV1 encoding the P2X7-antagonistic 13A7-hcAb were protected from the ATP induced shedding of CD62L and CD27 as expected from an antagonistic biologics. Conversely, T cells from mice injected with AAV1 vector coding for the P2X7-potentiating 14D5-dimHLE construct showed enhanced sensitivity in this assay, even at the lowest 30 μ M doses of ATP (**Fig. 1 C-E**). Hence these data confirmed the antagonistic effect of the 13A7-hcAb, and conversely the potentiating effect of 14D5-DimHLE biologics produced in vivo upon a single i.m. injection of the corresponding AAV vectors.

Nanobody-based biologics inhibiting P2X7 function have a beneficial anti-tumor effect in tumor models that express P2X7

To evaluate the effect of the blocking and the potentiation nanobody-based biologics in the tumor context, we thought to injected i.m. the corresponding AAV vector to induce their continuous expression in vivo. However, as expression of P2X7 in tumor cells has been reported to influence tumor growth per se, owing to a trophic effect of P2X7 tonic stimulation, we first evaluated the levels of P2X7 expression at the surface of each tumor model. Results demonstrate that Lewis lung carcinoma (LLC) express very low surface levels of P2X7, while the melanoma B16F10 display intermediate P2X7 levels,

and the EG7 thymoma express the highest levels (**Fig. 2A**). These tumor cells were then inoculated in groups of animals that have received AAV1 vector coding for 13A7-hcAb or 14D5-dimHLE three weeks before tumor inoculation and tumor volume were measured on the following days (**Fig. 2B**). For the LLC model expressing low levels of P2X7, we observed no significant effect of the nanobody-based biologic on tumor growth although a tendency could be observed of better tumor control in the group that have received the AAV vector coding for 14D5-dimHLE (**Fig. 2C**), resulting in better survival in this group (**Fig. 2D**). In the B16F10 melanoma model, the potentiating 14D5-dimHLE biologics had no effect on tumor growth, while the antagonistic 13A7-hcAb significantly reduced tumor growth (**Fig. 2D**) and slightly improved survival, but not significantly (**Fig. 2E**). In the EG7 thymoma model, expressing the highest level of P2X7, we observed again that the P2X7 potentiating biologics had no effect on the early phase of tumor growth. However, as also observed in the melanoma model, blocking P2X7 with the 13A7-hcAb biologics significantly decreased tumor growth and improved mice survival (**Fig. 2 E, F**). Interestingly, a gradation of the beneficial effect of the blocking 13A7-hcAb biologics could be noticed, in direct relation with the surface expression of P2X7 in each of these tumor models (**Fig. 2 A, C, E, F**). Taken together, these results suggest that inhibition of P2X7 significantly reduce tumor growth, when P2X7 is expressed at the surface of the tumor cells.

Potential of P2X7 function in vivo by the 14D5-DimHLE biologics influence the composition of the immune infiltrates in the melanoma model

Next, we turned to the B16F10-Ova melanoma model with the aim to study the composition of the immune infiltrates, and possibly to detect anti-Ova T cells that could emerge if adaptive immune response is induced by the nanobody-based therapies. For that, the experiment was repeated in this model in groups of mice that received or not AAV-vectors coding for 14D5-DimHLE or 13A7-hcAb. Monitoring of the tumor growth first confirmed the previous results obtained with the B16F10 original model, and showed again that the 13A7-hcAb inhibit tumor growth in the early phase of tumor progression, while 14D5-DimHLE did not induce any measurable effect (**Fig. 3A**). Next, 14 days after tumor inoculation, the tumor was resected, and a single suspension was prepared to study the composition of the immune infiltrates in the different groups. We observed that the nanobody-based biologics 14D5-dimHLE alter more significantly the composition of the lymphoid compartment in the tumor microenvironment as compared to control mice (**Fig. 3B, C and D**). Indeed, 14D5-dimHLE biologics decreased the proportion of CD4⁺ T cells and increased the proportion of CD8⁺ T cells (**Fig. 3E**). 13A7-hcAB biologics in contrast did not alter the lymphoid compartment but reduced the proportion of CD11b⁺ CD11c⁻ myeloid cells (**Fig. 3E**). Both 13A7-hcAB and 14D5-dimHLE biologics decreased percentage of CD4⁺ T cells expressing the exhaustion marker TIGIT, and more importantly, the proportion of conventional CD4⁺ T lymphocytes expressing the immunosuppressive enzymes CD39

and CD73, two important purinergic checkpoints (**Fig. 3F**). These ecto-enzymes tended to be also less expressed at the surface of the Tregs, although with a higher variability. Although the composition of the tumor microenvironment appeared modified by the biologics treatment, with a reduction of immunosuppressive cells, this was obviously not enough to reject the tumor. This was also in agreement with the absence of detectable CD8⁺ T cells recognizing the immunogenic Ova antigen derived from the tumor (data not shown). These results indicate that both biologics targeting P2X7 can influence the composition of the tumor microenvironment, even for the potentiating 14D5-DimHLE biologics that did not show any effect on the tumor growth in this model. Taken together, this suggested that although P2X7 potentiation induces a more favorable tumor microenvironment for the emergence and for the activation of anti-tumor immune cells, this was clearly not enough alone to control tumor progression in this aggressive melanoma model.

Evaluation of the P2X7 potentiating and blocking biologics in combination with an immunogenic chemotherapy treatment in the EG7 tumor model

We next thought to evaluate our P2X7 targeting biologics in combination with an immunogenic chemotherapy treatment. We reasoned that such a treatment should indeed increase the concentration of ATP in the tumor microenvironment and may therefore synergize with P2X7 targeting. As the EG7 model, was previously shown to be sensitive to Oxaliplatin in vivo and to induce an immunogenic cell death that rely on ATP release in vivo, we turned to this model (Ghiringhelli et al. 2009). We notably expected that the potentiating 14D5-dimHLE nanobody-based biologics would favor the emergence of anti-tumor immune response and would decrease promote tumor control when given in combination with oxaliplatin. To evaluate this hypothesis, we injected as before the AAV vector coding for both biologics 3 weeks before EG7 tumor inoculation. A single dose of oxaliplatin was then injected 7 days after tumor inoculation when tumors reached around 50 mm³ in volume (**Fig. 4A**). As expected, oxaliplatin use at 5 mg/kg decreased tumor growth but did not induce complete tumor rejection. When combined with the 14D5-dimHLE potentiating biologics a better tumor control was observed, leading to tumor rejections in most of the mice (**Fig. 4B**). Taking advantage of the expression of the ova antigen by this tumor cell lines, we also monitored the emergence of anti-Ova CD8⁺ specific T cell in the blood of these mice, 14 and 22 days post tumor inoculation. The data indeed suggested that the combination of oxaliplatin and 14D5-DimHLE resulted in more prominent CD8⁺ T cells stimulation that in the other controls groups (**Fig. 4C and 4D**). This was also the case when the anti-ova IgG responses were evaluated, suggesting a higher level of immune stimulation in this group (**Fig. 4E**). Interestingly, we also noticed a better tumor control in the group of mice that have received oxaliplatin together with the P2X7-blocking 13A7-hcAbs biologics (**Fig. 4B**). As EG7 tumor cell line express high level of P2X7, we assumed that this effect was related to the inhibition of the tonic stimulation of P2X7 at the surface

of this tumor cell line. This is in agreement with the lower stimulation of immune cells in this group in comparison with the previous one (**Fig. 4C, D and E**). Taken together, these data suggest that both biologics targeting P2X7, the blocking 13A7-hcAbs as well as the potentiating 14D5-DimHLE, can improve tumor controls in combination with oxaliplatin chemotherapy, although with different mechanism of action.

Evaluation of nanobody-based biologic targeting CD73, PD-L1, or both, in the EG7 and B16F10 tumor models

We next aimed to evaluate other nanobody-based biologics using our methodological approach, combined or not with 14D5-DimHLE treatment. As CD73 has emerged as a key purinergic checkpoint in the tumor microenvironment, with designed a construct targeting this molecule, based on the nanobody clone SB121, that have shown antagonistic effect on the enzymatic activity of CD73 in vitro. As for the 14D5-DimHLE, the construct targeting CD73, termed anti-CD73-DimHLE, was designed to contain a dimer of the SB121 nanobody, coupled to an anti-albumin nanobody to increase its half-life in vivo. For comparison, we also designed a nanobody-based construct targeting the well-known PD-L1 immune checkpoint, that we termed anti-PDL1-DimHLE. For that, we use a similar DimHLE format based on the nanobody clone B3 that have been previously demonstrate to specifically block the interaction between PD-L1 and its cognate receptor PD-1 (Ingram et al. 2017). Finally, we also designed a bispecific construct targeting both CD73 and PD-L1, as both protein are overexpressed by the tumor cells and/or by the immune infiltrates that compose the tumor microenvironment (Beavis et al. 2012). We termed this nanobody-based biologics anti-CD73/PDL1-HLE and we reasoned that this bispecific construct might not only improve T cell activation by inhibiting the inhibitory PD-1/PD-L1 axis, but might also inhibit the accumulation of the anti-inflammatory adenosine in the tumor microenvironment that constitutes another non-redundant immunosuppressive mechanism. Evaluation of the monospecific and the bispecific nanobody-based biologics were performed using again our AAVnano methodological approach in the EG7 thymoma model (**Fig. 5**) as well as in the more aggressive and less immunogenic B16F10 melanoma model (**Fig. 6**). For that, AAV8 vector coding for anti-CD73-DimHLE, anti-PDL1-DimHLE, anti-CD73/PDL1-HLE were generated and injected i.m. in different groups of mice. A group injected with the AAV1 vector coding for the 14D5-DimHLE, the P2X7-potentiating biologics, was also included for comparison. As before, EG7 or B16F10 tumor cell lines were inoculated 3 weeks later (**Fig. 5A and 6A**). As in the previous experiments, the 14D5-DimHLE biologic did not promote tumor control of EG7 nor of B16F10 tumor, when used alone, and was statistically indistinguishable from the PBS control group, both in terms of tumor growth as well as in terms of survival (**Fig. 5 B-C and 6 B-C**). Similarly, the anti-CD73-DimHLE biologics did not inhibit tumor growth nor survival in both tumor models. In contrast, the bispecific biologics anti-CD73/PDL1-HLE significantly promoted the control

of tumor growth in the B16F10 melanoma model, or even complete tumor rejection in the EG7 model, as well as improved mice survival in both tumor models (**Fig. 5 B-C and 6 B-C**). Interestingly, in both tumor models, this novel bispecific construct also tended to be more efficient than the anti-PDL1-DimHLE biologics, in terms of reduction of tumor growth as well as in terms of mice survival.

Finally, we also evaluated anti-CD73-DimHLE, anti-PDL1-DimHLE, and anti-CD73/PDL1-HLE, in combination with the 14D5-dimHLE biologics. For that, an AAV1 vector coding for 14D5-dimHLE was injected in the gastrocnemius while AAV8 vectors coding for the second biologics was injected in the quadriceps to promote concomitant expression of two biologics at the same time. As in the previous experiment, EG7 or B16F10 tumor cell lines were inoculated 3 weeks later (**Fig. 5A and 6A**). In both tumor models, the anti-CD73-DimHLE did not significantly synergize with the 14D5-dimHLE biologics, neither on the control of tumor growth nor in terms of mice survival (**Fig. 5 D-E and 6 D-E**). In contrast, tumor growth was better controlled and mice survival was significantly improved in the groups that have received anti-PDL1-DimHLE, or anti-CD73/PDL1-HLE, in addition to the 14D5-dimHLE biologics, suggesting at least that the beneficial effects of anti-PDL1-DimHLE, and anti-CD73/PDL1-HLE are maintained in the presence of the P2X7-potentiating construct. However, as compared with the data obtained for each individual construct, the data did not demonstrate a better anti-tumor effect in combination with 14D5-dimHLE biologics. In fact, this was difficult to evaluate in the less aggressive EG7 tumor model as both mono as well as combined therapy led to near complete tumor rejection and survival of nearly all the mice in these cohorts (**Fig. 5 B vs D, and C vs E**). However, when comparing the data in the more aggressive B16F10 melanoma model, the combined therapy tended to be slightly less efficient than anti-PDL1-DimHLE or anti-CD73/PDL1-HLE given alone (**Fig. 6 B vs D, and C vs E**). This would suggest that by favoring the stimulation of P2X7 on the surface of the tumor cells, the potentiating 14D5-dimHLE on the long run, displays a net effect that is rather in favor of the stimulation of the tumor progression, than in favor of the stimulation of the anti-tumor immune response. This may suggest that short term P2X7 potentiation, by means of direct injection of the recombinant 14D5-dimHLE biologics, may be better suited than its continuous stimulation, to tip the balance in favor of the activation of the immune system. This would have however to be tested in future experiments in a broader range of tumor type, that express or not P2X7. We concluded however, from the present data that targeting both CD73 and PD-L1 with a bispecific nanobody-based biologics represent a promising approach in cancer treatment.

Discussion

The TME is a dynamic environment and the privileged site where tumors are in close contact with the host. The biochemical and cellular composition of the TME is of paramount importance for the regulation of tumor cell metabolism, proliferation, motility and dissemination. The TME can both

provide a protective, anti-tumor immune response and generate an immunosuppressive environment that facilitates tumour growth. The biochemical composition of TME is a result of the activity of the tumour and host cells. Over the last few years, the abundance of eATP was identified as a prominent TME characteristic (Giuliani, Sarti, and Di Virgilio 2019). Cell damage leads to plasma membrane damage and therefore stressed or dying cells are an important source of eATP in the TME (Francesco Di Virgilio, Giuliani, et al. 2018). Hypoxia itself is a powerful stimulus for ATP release, even in the absence of cell damage. In the TME, eATP bind to P2Y and P2X receptors and can be further degraded into the immunosuppressive adenosine that exert its effect via the widely expressed P1 receptors. Among the P2 receptors, the role of the P2X7 receptor has been widely implicated in several types of cancer and suggested to be involved in the complex dialog between tumor and immune cells within the TME (Lara et al. 2020c). The balance between ATP release and its degradation by a variety of ecto-enzymes determines the concentration of eATP in the TME. Various cells release ATP, either as part of the normal metabolism or when responding to activation, metabolic or mechanical stress, or signals that induce cell death. This has been documented for numerous cells, including cancer cells, dendritic cells, tumor-infiltrating neutrophils, tumor-associated macrophages or platelets. Once release, eATP is then rapidly catabolized to ADP and AMP, and then to the immunosuppressive adenosine, essentially by the sequential activity of CD39 and CD73. These ecto-enzyme are expressed by many cell types in the TME, including some cancer cells, cancer-associated fibroblasts (CAFs), cytotoxic T cells, Tregs, as well as subsets of NKs, M2-like tumor associated macrophages (TAMs) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (Kepp et al. 2021).

In this study we used the AAVnano methodology approach (Demeules et al. 2020) to evaluate the anti-tumor potential of several nanobody-based biologics in several tumor models. Nanobodies, as well as for classical antibodies, offer excellent target specificity that may prevent unwanted off-target effects that may sometimes be observed with small chemical drugs. We selected nanobodies that bind specifically to mouse P2X7 and that do not recognize the close paralogs P2X4 and P2X1 (Danquah et al. 2016). We chose to express our nanobody-based biologics directly in vivo upon AAV vectors mediated gene transfer. AAV vector are widely used in gene therapy settings and represent an efficient and safe approach to transfer gene of interest into muscle cells and to elicit long-term systemic in situ production of a transgenic protein, including selected antibodies that confers protection to infectious diseases (Balazs et al. 2014; Saunders et al. 2015). In our experimental approach, we previously demonstrated that a single intramuscular administration of the AAV vector (10^{11} viral genomes per mouse) coding for our engineered nanobody-based constructs, was sufficient to elicit the in vivo production of saturating levels of each biologics at studied, that persist for several months. We validated here, prior to the tumor inoculation, that the blocking or the potentiating P2X7-specific biologics were produced in vivo and were able to completely block P2X7 (i.e., for the 13A7-hcAb biologics) or to potentiate its activity notably at low ATP concentration (i.e., for the 14D5-DimHLE construct) (**Fig.**

1, and data not shown). As a hallmark associated with P2X7 receptor activation, we used a sensitive *ex vivo* assay based on metalloprotease-dependent shedding of CD27 and CD62L from the T cell surface. Our data demonstrate that a single intramuscular injection of a AAV encoding the P2X7-antagonistic 13A7hcAb protects T cells from ATP-induced CD27 and CD62L shedding (**Fig. 1C, 1D and 1E**). The P2X7-potentiating 14D5-dimHLE sensitized T cells to ATP-induced shedding of CD27 and CD62L (**Fig. 1C, 1D and 1E**). We next used our AAVnano methodological approach to evaluate the net consequences of either blocking, or potentiating, P2X7 in tumor different tumor models. The tumor models were selected for their differential level of P2X7 surface expression, ranging from very low, in the lung carcinoma model LLC, intermediate in the B16F10 melanoma model, to relatively high expression in the EG7 thymoma model (**Fig. 2A**). As P2X7 expression and its tonic stimulation in the context of the ATP-rich microenvironment has been associated with tumor growth and invasiveness, it appeared indeed important to take into account this parameter in our study. Importantly, none of this tumor cell line are rapidly induced to cell death by concentrations of ATP that are below the millimolar range, while this is the case for mouse T cells (data not shown). This indicate, as suggested by different studies, that the P2X7 receptor in tumor cells does not behave as a cytolytic receptor. This may results from the expression of particular splice variants, or mutated version of the receptor, that remained to be characterized in our tumor lines. This has been however studied in a wide variety of human cancer cells, and results in the expression of P2X7 variants that have lost their cytolytic properties, but have retained the capacity to trigger calcium influx in response to ATP. Therefore, blocking P2X7 is expected to inhibit tonic tumor cells stimulation and tumor progression. Our results are in perfect agreement with this hypothesis. We demonstrate that blocking P2X7 in the LLC lung carcinoma model had no effect on the tumor progression and mice survival, a result that is in line with the very low surface expression of P2X7 in this tumor line (**Fig. 2 A, C, D**). For the two other tumor models, our data point to a gradation of the beneficial effect of the 13A7-hcAb biologics, in direct relation with the surface expression of P2X7 in each of these tumor models. Indeed, the P2X7-blocking 13A7-hcAb biologics more potently inhibit tumor growth in the EG7 tumor model, which displays the highest P2X7 surface levels, than in the B16F10 model that expresses intermediate level of P2X7 (**Fig. 2 A, C, E, F**). Taken together, these results suggest that inhibition of P2X7 significantly reduce tumor growth and improve survival, when P2X7 is expressed at the surface of the tumor cells.

To better understand the biologic effects of the nanobody-based biologics targeting P2X7 on the composition of the tumor microenvironment, we next studied the frequency and the phenotype of the cell present in the tumor infiltrate. For that, we resected the tumor and analysed the cell profiles by flow cytometry. We observed that the nanobody-based biologics 14D5-dimHLE, that was paradoxically not associated with any beneficial effect on tumor growth nor on survival, significantly alters the composition of the lymphoid compartment in the tumor microenvironment as compared to control mice

(**Fig. 3B, C and D**). Notably, 14D5-dimHLE biologics was found to decrease the proportion of CD4⁺ T cells and increased the proportion of CD8⁺ T cells, which may indicate the stimulation of anti-tumor T cells (**Fig. 3E**). This treatment, was also associated with a decreased in the expression of the exhaustion marker TIGIT, and a decrease in the expression of CD39 and CD73, two ecto enzymes considered as important and targetable purinergic checkpoints. This suggested that P2X7 potentiation by the 14D5-dimHLE biologics does contribute to the induction of a more favorable tumor microenvironment, possibly less immunosuppressive, but that this treatment alone was not sufficient for the emergence of a potent and effective anti-tumor immune response. As this result have been obtained in the B16F10 melanoma model, that express intermediate level of P2X7, higher tonic stimulation of P2X7 at the surface of the tumor cells, facilitated by the 14D5-dimHLE biologics, probably also contribute to the global effect of this biologics in vivo. This may be addressed in future studies using for instance B16F10 melanoma model that are deficient for P2X7 expression, to better delineate the potential beneficial effect of P2X7 stimulation on immune cells, from its detrimental effect on the tumor cells.

As 14D5-dimHLE biologics does not promote beneficial effect when used alone, we next evaluated whether potentiation of P2X7 can enhance anti-tumor immune responses when combined with other treatments, and notably in combination with immunogenic oxaliplatin chemotherapy that may increase the release of ATP in the tumor, or with anti-immune checkpoints therapy, or antagonism of CD73 enzymatic activity involved in the formation of the immunosuppressive adenosine from the catabolite of ATP. We first evaluated the combination therapy based on a single injection oxaliplatin in animal that have been injected before with AAV vector coding for the 14D5-dimHLE biologics (**Fig. 4A**). We observed that the combination of the two treatments leads to a significant decrease of tumor growth in the EG7 model (**Fig. 4B**), that was associated an increase in tumor-specific cellular and humoral immune responses (**Fig. 4C, D and E**). Hence these data suggest that P2X7 potentiation in the context of an immunogenic chemotherapy may reinforce the immune responses. The mechanism may involve its role on the stimulation and migration of dendritic cells, as well its role on the induction of Treg cell death that can contribute together with the emergence of an effective adaptive anti-tumor immune responses.

We then evaluated the 14D5-dimHLE P2X7-potentiating biologics in combination with other nanobody-based biologics that we generated, one targeting CD73 another important member of the purinergic signaling pathway, or PD-L1 a prototypic immune checkpoint. Another last construct was designed to target both CD73 and PD-L1 at the same time using a bispecific nanobody based biologics. We evaluated theses biologics in combination with 14D5-DimHLE construct in the EG7 thymoma model as well as in the less immunogenic B16F10 melanoma model, considered to be more aggressive. We did not observe any beneficial effect of these treatments when combined with 14D5-DimHLE, as compared to their evaluation as monotherapy (**Fig. 5 and 6**). In fact, the possible beneficial effect of the combination therapy was not possible to faithfully evaluate when combined with anti-CD73-DimHLE

or anti-CD73/PDL1-HLE biologics as both treatment alone were already very effective to induce tumor control. Nevertheless, this was at least the case for the treatment combining anti-PDL1-DimHLE and 14D5-DimHLE that were clearly not effective to promote tumor control and to improve survival. This may at least partly reflect the ATP-trophic stimulation of EG7 and B16F10 tumor lines that both express P2X7. Blocking CD73 may indeed increase the accumulation of ATP in the tumor microenvironment and P2X7 potentiation may further stimulate P2X7 at the surface of the tumor cells, tipping the balance in favor of tumor growth. Whether this is a plausible explanation may deserve further investigations, involving for instance the evaluation of the eATP concentration in the tumor microenvironment and its modification by these biologics.

In the course of these evaluations, we tested for the first time a bispecific biologics targeting CD73 and PD-L1, that we termed anti-CD73/PDL1-HLE. We thought here to combine a nanobody targeting the prototypical PD-L1 immune checkpoint, to an antibody targeting CD73 considered as an emerging targetable purine checkpoint in tumor. This anti-CD73/PDL1-HLE biologics were demonstrated here to significantly improve the control of tumor growth in the aggressive B16F10 melanoma model, or even to induce complete tumor rejection in the EG7 model, as well as improving mice survival in both tumor models (**Fig. 5 B-C and 6 B-C**). Interestingly, in both tumor models, this novel bispecific construct also tended to be more efficient than the anti-PDL1-DimHLE biologics, in terms of reduction of tumor growth as well as in terms of mice survival. The mechanism remains to be fully explored, but possibly rely on the inhibition of two complementary non-redundant immunosuppressive mechanisms that contribute together to progressive development of immunosuppressive tumor microenvironment. In line, previous studies demonstrated that antibodies directed against CD73 enhance the antitumor immune responses, when used in combination with anti-immune checkpoints (Neo et al. 2019). Also, as both CD73 and PD-L1 are overexpressed in the tumor microenvironment, this bispecific biologics may advantageously accumulate around the tumor to exert its beneficial effect but this remained however to be studied. We concluded however, from our present data that targeting both CD73 and PD-L1 with a bispecific nanobody-based biologics represent a promising approach in cancer treatment.

References

- ABBRACCHIO, MARIA P., GEOFFREY BURNSTOCK, JEAN-MARIE BOEYNAEMS, ERIC A. BARNARD, JOSÉ L. BOYER, CHARLES KENNEDY, GILLIAN E. KNIGHT, et al. 2006. "International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy." *Pharmacological Reviews* 58 (3): 281. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.3>.

- Abiko, K., N. Matsumura, J. Hamanishi, N. Horikawa, R. Murakami, K. Yamaguchi, Y. Yoshioka, T. Baba, I. Konishi, and M. Mandai. 2015. "IFN- γ from Lymphocytes Induces PD-L1 Expression and Promotes Progression of Ovarian Cancer." *British Journal of Cancer* 112 (9): 1501. <https://doi.org/10.1038/BJC.2015.101>.
- Ackaert, Chloé, Natalia Smiejkowska, Catarina Xavier, Yann G.J. Sterckx, Sofie Denies, Benoit Stijlemans, Yvon Elkrim, et al. 2021. "Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies." *Frontiers in Immunology* 12 (March). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.632687/FULL>.
- Adamczyk, Magdalena, Rhiannon Griffiths, Sharon Dewitt, Vera Knäuper, and Daniel Aeschlimann. 2015. "P2X7 Receptor Activation Regulates Rapid Unconventional Export of Transglutaminase-2." *Journal of Cell Science* 128 (24): 4615. <https://doi.org/10.1242/JCS.175968>.
- Adamson, Samantha E., and Norbert Leitinger. 2014. "The Role of Pannexin1 in the Induction and Resolution of Inflammation." *FEBS Letters* 588 (8): 1416. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.03.009>.
- Adinolfi, Elena, Maria Giulia Callegari, Maria Cirillo, Paolo Pinton, Carlotta Giorgio, Dario Cavagna, Rosario Rizzuto, and Francesco Di Virgilio. 2009. "Expression of the P2X7 Receptor Increases the Ca²⁺ Content of the Endoplasmic Reticulum, Activates NFATc1, and Protects from Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 284 (15): 10120–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805805200>.
- Adinolfi, Elena, Maria Giulia Callegari, Davide Ferrari, Chiara Bolognesi, Mattia Minelli, Mariusz R. Wieckowski, Paolo Pinton, Rosario Rizzuto, and Francesco Di Virgilio. 2005. "Basal Activation of the P2X7 ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-Independent Growth." *Molecular Biology of the Cell* 16 (7): 3260–72. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-1025>.
- Adinolfi, Elena, Marina Capece, Alessia Franceschini, Simonetta Falzoni, Anna L. Giuliani, Alessandra Rotondo, Alba C. Sarti, et al. 2015. "Accelerated Tumor Progression in Mice Lacking the ATP Receptor P2X7." *Cancer Research* 75 (4): 635–44. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1259>.
- Adinolfi, Elena, Maria Cirillo, Ronja Woltersdorf, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Patrizia Pellegatti, Maria Giulia Callegari, Doriana Sandonà, Fritz Markwardt, Günther Schmalzing, and Francesco Di Virgilio. 2010. "Trophic Activity of a Naturally Occurring Truncated Isoform of the P2X7 Receptor." *The FASEB Journal* 24 (9): 3393–3404. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-153601>.
- . 2010. "Trophic Activity of a Naturally Occurring Truncated Isoform of the P2X7 Receptor."

FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 24 (9): 3393–3404. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-153601>.

Adinolfi, Elena, Anna Lisa Giuliani, Elena De Marchi, Anna Pegoraro, Elisa Orioli, and Francesco Di Virgilio. 2018. “The P2X7 Receptor: A Main Player in Inflammation.” *Biochemical Pharmacology* 151: 234–44. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.021>.

Adinolfi, Elena, Elena De Marchi, Elisa Orioli, Anna Pegoraro, and Francesco Di Virgilio. 2019. “Role of the P2X7 Receptor in Tumor-Associated Inflammation.” *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.012>.

Adinolfi, Elena, Loredana Melchiorri, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Anna Morelli, Alessia Tieghi, Antonio Cuneo, Gianluigi Castoldi, Francesco Di Virgilio, and Olavio R. Baricordi. 2002. “P2X7 Receptor Expression in Evolutive and Indolent Forms of Chronic B Lymphocytic Leukemia.” *Blood* 99 (2): 706–8. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.2.706>.

Adinolfi, Elena, Lizzia Raffaghello, Anna Lisa Giuliani, Luigi Cavazzini, Marina Capece, Paola Chiozzi, Giovanna Bianchi, Guido Kroemer, Vito Pistoia, and Francesco Di Virgilio. 2012. “Expression of P2X7 Receptor Increases in Vivo Tumor Growth.” *Cancer Research* 72 (12): 2957–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1947>.

Adriouch, S, W Ohlrogge, F Haag, F Koch-Nolte, and M Seman. 2001. “Rapid Induction of Naive T Cell Apoptosis by Ecto-Nicotinamide Adenine Dinucleotide: Requirement for Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 2 and a Downstream Effector.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (1): 196–203. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.1.196>.

Adriouch, Sahil, Peter Bannas, Nicole Schwarz, Ralf Fliegert, Andreas H. Guse, Michel Seman, Friedrich Haag, Friedrich Koch-Noke, and Friedrich Koch-Noke. 2008. “ADP-ribosylation at R125 Gates the P2X7 Ion Channel by Presenting a Covalent Ligand to Its Nucleotide Binding Site.” *The FASEB Journal* 22 (3): 861–69. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9294com>.

Adriouch, Sahil, C Dox, V Welge, Michel Seman, Friedrich Koch-Nolte, and Friedrich Haag. 2002. “Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (8): 4108–12. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.8.4108>.

Adriouch, Sahil, Sandra Hubert, Severine Pechberty, Friedrich Koch-Nolte, Friedrich Haag, and Michel Seman. 2007. “NAD⁺ Released during Inflammation Participates in T Cell Homeostasis by Inducing ART2-Mediated Death of Naive T Cells in Vivo.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (1): 186–94. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.1.186>.

Aglietti, Robin A., and Erin C. Dueber. 2017. “Recent Insights into the Molecular Mechanisms

- Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions.” *Trends in Immunology* 38 (4): 261–71. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2017.01.003>.
- Ahmadzadeh, Mojgan, Laura A. Johnson, Bianca Heemskerk, John R. Wunderlich, Mark E. Dudley, Donald E. White, and Steven A. Rosenberg. 2009. “Tumor Antigen–Specific CD8 T Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of PD-1 and Are Functionally Impaired.” *Blood* 114 (8): 1537. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-12-195792>.
- Airas, Laura, Jussi Niemelä, Marko Salmi, Tarja Puurunen, David J. Smith, and Sirpa Jalkanen. 1997. “Differential Regulation and Function of CD73, a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked 70-KD Adhesion Molecule, on Lymphocytes and Endothelial Cells.” *The Journal of Cell Biology* 136 (2): 421–31. <https://doi.org/10.1083/JCB.136.2.421>.
- Alberto, A. V.P., R. X. Faria, C. G.C. Couto, L. G.B. Ferreira, C. A.M. Souza, P. C.N. Teixeira, M. M. Fróes, and L. A. Alves. 2013. “Is Pannexin the Pore Associated with the P2X7 Receptor?” *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 2013 386:9 386 (9): 775–87. <https://doi.org/10.1007/S00210-013-0868-X>.
- Allard, Bertrand, Paul A. Beavis, Phillip K. Darcy, and John Stagg. 2016. “Immunosuppressive Activities of Adenosine in Cancer.” *Current Opinion in Pharmacology* 29 (May): 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2016.04.001>.
- Allard, Bertrand, Maria Serena Longhi, Simon C. Robson, and John Stagg. 2017a. “The Ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel Checkpoint Inhibitor Targets” 276 (1): 121–44. <https://doi.org/10.1111/IMR.12528>.
- . 2017b. “The Ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel Checkpoint Inhibitor Targets.” *Immunological Reviews* 276 (1): 121–44. <https://doi.org/10.1111/IMR.12528>.
- Allard, Bertrand, Sandra Pommey, Mark J. Smyth, and John Stagg. 2013. “Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 MAbs.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (20): 5626–35. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0545>.
- Allard, Bertrand, Martin Turcotte, Kathleen Spring, Sandra Pommey, Isabelle Royal, and John Stagg. 2014. “Anti-CD73 Therapy Impairs Tumor Angiogenesis.” *International Journal of Cancer* 134 (6): 1466–73. <https://doi.org/10.1002/IJC.28456>.
- Allard, David, Bertrand Allard, Pierre Olivier Gaudreau, Pavel Chrobak, and John Stagg. 2016. “CD73-Adenosine: A next-Generation Target in Immuno-Oncology.” *Immunotherapy* 8 (2): 145–63. <https://doi.org/10.2217/IMT.15.106>.
- Allen, IC, MA Scull, CB Moore, EK Holl, E McElvania-TeKippe, DJ Taxman, EH Guthrie, RJ

- Pickles, and JP Ting. 2009. "The NLRP3 Inflammasome Mediates in Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA." *Immunity* 30 (4): 556–65. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2009.02.005>.
- Allsopp, Rebecca C., and Richard J. Evans. 2015. "Contribution of the Juxtatransmembrane Intracellular Regions to the Time Course and Permeation of ATP-Gated P2X7 Receptor Ion Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (23): 14556. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.642033>.
- Altintas, Isil, Raimond Heukers, Roy Van Der Meel, Marie Lacombe, Maryam Amidi, Paul M.P. Van Bergen En Henegouwen, Wim E. Hennink, Raymond M. Schiffelers, and Robbert J. Kok. 2013. "Nanobody-Albumin Nanoparticles (NANAPs) for the Delivery of a Multikinase Inhibitor 17864 to EGFR Overexpressing Tumor Cells." *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 165 (2): 110–18. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.11.007>.
- Alves, Luiz Anastacio, Rômulo José Soares Bezerra, Robson Xavier Faria, Leonardo Gomes Braga Ferreira, and Valber Da Silva Frutuoso. 2013. "Physiological Roles and Potential Therapeutic Applications of the P2X7 Receptor in Inflammation and Pain." *Molecules* 2013, Vol. 18, Pages 10953-10972 18 (9): 10953–72. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES180910953>.
- Alzola, E, A Pérez-Etxebarria, E Kabré, DJ Fogarty, M Métioui, N Chaïb, JM Macarulla, C Matute, JP Dehay, and A Marino. 1998. "Activation by P2X7 Agonists of Two Phospholipases A2 (PLA2) in Ductal Cells of Rat Submandibular Gland. Coupling of the Calcium-Independent PLA2 with Kallikrein Secretion." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30208–17. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.46.30208>.
- Amoroso, F., M. Capece, A. Rotondo, D. Cangelosi, M. Ferracin, A. Franceschini, L. Raffaghello, V. Pistoia, L. Varesio, and E. Adinolfi. 2015. "The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of the PI3K/GSK3 β /VEGF Signaling Network: Evidence in Experimental Neuroblastoma." *Oncogene* 34 (41): 5240–51. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.444>.
- Amoroso, F., S. Falzoni, E. Adinolfi, D. Ferrari, and F. Di Virgilio. 2012. "The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of Aerobic Glycolysis." *Cell Death & Disease* 2012 3:8 3 (8): e370–e370. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2012.105>.
- Amoroso, Francesca, Erica Salari, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Anna Lisa Giuliani, Giorgio Cavallero, Pio Maniscalco, et al. 2016. "P2X7 Targeting Inhibits Growth of Human Mesothelioma." *Oncotarget* 7 (31): 49664–76. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.10430>.
- Amstrup, Jan, and Ivana Novak. 2003a. "P2X7 Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases ERK1 and ERK2 Independently of Ca²⁺ Influx." *Biochemical Journal* 374 (Pt 1): 51.

- <https://doi.org/10.1042/BJ20030585>.
- . 2003b. “P2X7 Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases ERK1 and ERK2 Independently of Ca²⁺ Influx.” *Biochemical Journal* 374 (1): 51–61.
<https://doi.org/10.1042/BJ20030585>.
- Anselimi, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessaris N, et al. 2008. “ATP Release through Connexin Hemichannels and Gap Junction Transfer of Second Messengers Propagate Ca²⁺ Signals across the Inner Ear.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48): 18770–75. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0800793105>.
- Apolloni, Savina, Paola Fabbri, Susanna Amadio, Giulia Napoli, Mattia Freschi, Francesca Sironi, Paolo Pevarello, et al. 2021. “Novel P2X7 Antagonist Ameliorates the Early Phase of ALS Disease and Decreases Inflammation and Autophagy in SOD1-G93A Mouse Model.” *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 10649 22 (19): 10649.
<https://doi.org/10.3390/IJMS221910649>.
- Aprile-Garcia, Fernando, Michael W. Metzger, Marcelo Paez-Pereda, Herbert Stadler, Matías Acuña, Ana C. Liberman, Sergio A. Senin, et al. 2016. “Co-Expression of Wild-Type P2X7R with Gln460Arg Variant Alters Receptor Function.” *PLOS ONE* 11 (3): e0151862.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0151862>.
- Arulkumaran, Nishkantha, Robert J. Unwin, and Frederick W.K. Tam. 2011a. “A Potential Therapeutic Role for P2X7 Receptor (P2X7R) Antagonists in the Treatment of Inflammatory Diseases.” *Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1517/13543784.2011.578068* 20 (7): 897–915. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.578068>.
- . 2011b. “A Potential Therapeutic Role for P2X7 Receptor (P2X7R) Antagonists in the Treatment of Inflammatory Diseases.” *Expert Opinion on Investigational Drugs* 20 (7): 897–915.
<https://doi.org/10.1517/13543784.2011.578068>.
- As-, Humoral, Hypersensitive States, S Raffel, Delayed Hypersensitiv, R E Billingham, and M Grodsky. 1965. “Adenovirus-Associated Virus” 149.
- Aswad, Fred, Hiroki Kawamura, and Gunther Dennert. 2005. “High Sensitivity of CD4+CD25+ Regulatory T Cells to Extracellular Metabolites Nicotinamide Adenine Dinucleotide and ATP: A Role for P2X7 Receptors.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (5): 3075–83.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.5.3075>.
- Atarashi, Koji, Junichi Nishimura, Tatsuichiro Shima, Yoshinori Umesaki, Masahiro Yamamoto, Masaharu Onoue, Hideo Yagita, et al. 2008. “ATP Drives Lamina Propria T(H)17 Cell Differentiation.” *Nature* 455 (7214): 808–12. <https://doi.org/10.1038/NATURE07240>.

- Auger, Rodolphe, Iris Motta, Karim Benihoud, David M. Ojcius, and Jean M. Kanellopoulos. 2005. "A Role for Mitogen-Activated Protein KinaseErk1/2 Activation and Non-Selective Pore Formation in P2X7 Receptor-Mediated Thymocyte Death." *Journal of Biological Chemistry* 280 (30): 28142–51. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501290200>.
- Aymeric, Laetitia, Lionel Apetoh, François Ghiringhelli, Antoine Tesniere, Isabelle Martins, Guido Kroemer, Mark J Smyth, and Laurence Zitvogel. 2010. "Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity Setting the Stage." <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3566>.
- Azuma, Takeshi, Sheng Yao, Gefeng Zhu, Andrew S. Flies, Sarah J. Flies, and Lieping Chen. 2008. "B7-H1 Is a Ubiquitous Antiapoptotic Receptor on Cancer Cells." *Blood* 111 (7): 3635–43. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-11-123141>.
- Backlund, Lena, Catharina Lavebratt, Louise Frisén, Pernilla Nikamo, Dzana Hukic Sudic, Lil Träskman-Bendz, Mikael Landén, et al. 2012. "P2RX7: Expression Responds to Sleep Deprivation and Associates with Rapid Cycling in Bipolar Disorder Type 1." *PLoS ONE* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0043057>.
- Balazs, Alejandro B., Yong Ouyang, Christin M. Hong, Joyce Chen, Steven M. Nguyen, Dinesh S. Rao, Dong Sung An, and David Baltimore. 2014. "Vectored Immunoprophylaxis Protects Humanized Mice from Mucosal HIV Transmission." *Nature Medicine* 20 (3): 296–300. <https://doi.org/10.1038/nm.3471>.
- Banchereau, Jacques, and Ralph M. Steinman. 1998. "Dendritic Cells and the Control of Immunity." *Nature* 392:6673 392 (6673): 245–52. <https://doi.org/10.1038/32588>.
- Bannas, Peter, Sahil Adriouch, Sarah Kahl, Fenja Braasch, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2005. "Activity and Specificity of Toxin-Related Mouse T Cell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 Depends on Its Association with Lipid Rafts." *Blood* 105 (9): 3663–70. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-08-3325>.
- Bannas, Peter, Julia Hambach, and Friedrich Koch-Nolte. 2017. "Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics." *Frontiers in Immunology* 8 (November): 1603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>.
- Banz, Yara, Guido Beldi, Yan Wu, Ben Atkinson, Anny Usheva, and Simon C. Robson. 2008. "CD39 Is Incorporated into Plasma Microparticles Where It Maintains Functional Properties and Impacts Endothelial Activation." *British Journal of Haematology* 142 (4). <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2008.07230.X>.
- Barden, J. A., R. Sluyter, B. J. Gu, and J. S. Wiley. 2003. "Specific Detection of Non-Functional

- Human P2X(7) Receptors in HEK293 Cells and B-Lymphocytes.” *FEBS Letters* 538 (1–3): 159–62. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00172-8).
- Baricordi, O. Roberte, Loredana Melchiorri, Elena Adinolfi, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Gary Buell, and Francesco Di Virgilio. 1999. “Increased Proliferation Rate of Lymphoid Cells Transfected with the P2X7 ATP Receptor *.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (47): 33206–8. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.47.33206>.
- Bartlett, Rachael, Leanne Stokes, and Ronald Sluyter. 2014. “The P2x7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2x7 Antagonists in Models of Disease.” *Pharmacological Reviews* 66 (3): 638–75. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>.
- Basso, Ana M., Natalie A. Bratcher, Richard R. Harris, Michael F. Jarvis, Michael W. Decker, and Lynne E. Rueter. 2009. “Behavioral Profile of P2X7 Receptor Knockout Mice in Animal Models of Depression and Anxiety: Relevance for Neuropsychiatric Disorders.” *Behavioural Brain Research* 198 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2008.10.018>.
- Bastid, J., A. Cottalorda-Regairaz, G. Alberici, N. Bonnefoy, J. F. Eliaou, and A. Bensussan. 2013. “ENTPD1/CD39 Is a Promising Therapeutic Target in Oncology.” *Oncogene* 32 (14): 1743–51. <https://doi.org/10.1038/ONC.2012.269>.
- Beamer, Edward, Wolfgang Fischer, and Tobias Engel. 2017. “The ATP-Gated P2X7 Receptor as a Target for the Treatment of Drug-Resistant Epilepsy.” *Frontiers in Neuroscience* 11 (FEB): 21. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2017.00021/BIBTEX>.
- Beavis, Paul A., John Stagg, Phillip K. Darcy, and Mark J. Smyth. 2012. “CD73: A Potent Suppressor of Antitumor Immune Responses.” *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>.
- Becker, D, R Woltersdorf, W Boldt, S Schmitz, U Braam, G Schmalzing, and F Markwardt. 2008. “The P2X7 Carboxyl Tail Is a Regulatory Module of P2X7 Receptor Channel Activity.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (37): 25725–34. <https://doi.org/10.1074/JBC.M803855200>.
- Bellucci, Roberto, Allison Martin, Davide Bommarito, Kathy Wang, Steen H. Hansen, Gordon J. Freeman, and Jerome Ritz. 2015. “Interferon- γ -Induced Activation of JAK1 and JAK2 Suppresses Tumor Cell Susceptibility to NK Cells through Upregulation of PD-L1 Expression.” *Oncoimmunology* 4 (6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008824>.
- Benzaquen, Jonathan, Serena Janho Dit Hreich, Simon Heeke, Thierry Juhel, Salomé Lalive, Serge Bauwens, Simona Saccani, et al. 2020. “P2RX7B Is a New Theranostic Marker for Lung Adenocarcinoma Patients.” *Theranostics* 10 (24): 10849–60. <https://doi.org/10.7150/THNO.48229>.

- Benzaquen, Jonathan, Simon Heeke, S  rena Janho dit Hreich, Laetitia Douguet, Charles Hugo Marquette, Paul Hofman, and Valérie Vouret-Craviari. 2019. "Alternative Splicing of P2RX7 Pre-Messenger RNA in Health and Diseases: Myth or Reality?" *Biomedical Journal* 42 (3): 141–54. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.05.007>.
- Bernier, Louis Philippe, Ariel R. Ase, and Philippe Séguéla. 2013. "Post-Translational Regulation of P2X Receptor Channels: Modulation by Phospholipids." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (NOV): 226. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00226/BIBTEX>.
- Beyer, E. C., and T. H. Steinberg. 1991. "Evidence That the Gap Junction Protein Connexin-43 Is the ATP-Induced Pore of Mouse Macrophages." *Journal of Biological Chemistry* 266 (13): 7971–74. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92924-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92924-8).
- Bhattacharya, Anindya, Brian Lord, Jan Sebastian Grigoleit, Yingbo He, Ian Fraser, Shannon N. Campbell, Natalie Taylor, et al. 2018. "Neuropsychopharmacology of JNJ-55308942: Evaluation of a Clinical Candidate Targeting P2X7 Ion Channels in Animal Models of Neuroinflammation and Anhedonia." *Neuropsychopharmacology* 2018 43:13 43 (13): 2586–96. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0141-6>.
- Bian, Shu, Xiaofeng Sun, Aiping Bai, Chunqing Zhang, Linglin Li, Keichi Enjyoji, Wolfgang G. Junger, Simon C. Robson, and Yan Wu. 2013. "P2X7 Integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-MTOR Signaling Pathways to Mediate Tumor Cell Death." *PLOS ONE* 8 (4): e60184. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060184>.
- Bianchi, G., M. Vuerich, P. Pellegatti, D. Marimpietri, L. Emionite, I. Marigo, V. Bronte, F. Di Virgilio, V. Pistoia, and L. Raffaghello. 2014. "ATP/P2X7 Axis Modulates Myeloid-Derived Suppressor Cell Functions in Neuroblastoma Microenvironment." *Cell Death and Disease* 5 (3): e1135-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.109>.
- Bidula, Stefan, Kshitija Dhuna, Ray Helliwell, and Leanne Stokes. 2019. "Positive Allosteric Modulation of P2X7 Promotes Apoptotic Cell Death over Lytic Cell Death Responses in Macrophages." *Cell Death and Disease* 10 (12): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2110-3>.
- Bidula, Stefan M., Brett A. Cromer, Samuel Walpole, Jesus Angulo, and Leanne Stokes. 2019. "Mapping a Novel Positive Allosteric Modulator Binding Site in the Central Vestibule Region of Human P2X7." *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-39771-5>.
- Blasetti Fantauzzi, Claudia, Stefano Menini, Carla Iacobini, Chiara Rossi, Eleonora Santini, Anna Solini, and Giuseppe Pugliese. 2017. "Deficiency of the Purinergic Receptor 2X7 Attenuates Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by High-Fat Diet: Possible Role of the NLRP3

- Inflammasome.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/8962458>.
- Boison, Detlev, and Gennady G. Yegutkin. 2019. *Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy*. *Cancer Cell*. Vol. 36. Cell Press.
- Bono, María Rosa, Dominique Fernández, Felipe Flores-Santibáñez, Mario Roseblatt, and Daniela Sauma. 2015. *CD73 and CD39 Ectonucleotidases in T Cell Differentiation: Beyond Immunosuppression*. *FEBS Letters*. Vol. 589. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>.
- Borea, Pier Andrea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, Fabrizio Vincenzi, and Katia Varani. 2018. “Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art.” *Physiol Rev* 98 (3): 1591–1625.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017.-Adenosine>.
- Borges da Silva, Henrique, Lalit K. Beura, Haiguang Wang, Eric A. Hanse, Reshma Gore, Milcah C. Scott, Daniel A. Walsh, et al. 2018. “The Purinergic Receptor P2RX7 Directs Metabolic Fitness of Long-Lived Memory CD8+ T Cells.” *Nature* 559 (7713): 264–68.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0282-0>.
- Borges da Silva, Henrique, Changwei Peng, Haiguang Wang, Kelsey M. Wanhainen, Chaoyu Ma, Sharon Lopez, Alexander Khoruts, Nu Zhang, and Stephen C. Jameson. 2020. “Sensing of ATP via the Purinergic Receptor P2RX7 Promotes CD8+ Tm Cell Generation by Enhancing Their Sensitivity to the Cytokine TGF- β .” *Immunity* 53 (1): 158.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476132030265X>.
- Borsellino, G, M Kleiweietfeld, D Di Mitri, A Sternjak, A Diamantini, R Giometto, S Höpner, et al. 2007. “Expression of Ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg Cells: Hydrolysis of Extracellular ATP and Immune Suppression.” *Blood* 110 (4): 1225–32. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-12-064527>.
- Bour-Jordan, Hélène, Jonathan H. Esensten, Marc Martinez-Llordella, Cristina Penaranda, Melanie Stumpf, and Jeffrey A. Bluestone. 2011. “Intrinsic and Extrinsic Control of Peripheral T-Cell Tolerance by Costimulatory Molecules of the CD28/B7 Family.” *Immunological Reviews* 241 (1): 180. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2011.01011.X>.
- Boussemart, Lise, Isabelle Girault, Hélène Malka-Mahieu, Christine Mateus, Emilie Routier, Margot Rubington, Nyam Kamsu-Kom, et al. 2016. “Secondary Tumors Arising in Patients Undergoing BRAF Inhibitor Therapy Exhibit Increased BRAF-CRAF Heterodimerization.” *Cancer Research* 76 (6): 1476–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2900-T>.
- Bowser, Jessica L., Michael R. Blackburn, Gregory L. Shipley, Jose G. Molina, Kenneth Dunner, and

- Russell R. Broaddus. 2016. "Loss of CD73-Mediated Actin Polymerization Promotes Endometrial Tumor Progression." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (1): 220–38. <https://doi.org/10.1172/JCI79380>.
- Boyd-Tressler, Andrea, Silvia Penuela, Dale W. Laird, and George R. Dubyak. 2014. "Chemotherapeutic Drugs Induce ATP Release via Caspase-Gated Pannexin-1 Channels and a Caspase/Pannexin-1-Independent Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (39): 27246. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.590240>.
- Bratton, DL, VA Fadok, DA Richter, JM Kailey, LA Guthrie, and PM Henson. 1997. "Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-Mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26159–65. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.42.26159>.
- Brisson, Lucie, Stéphanie Chadet, Osbaldo Lopez-Charcas, Bilel Jelassi, David Ternant, Julie Chamouton, Stéphanie Lerondel, et al. 2020. "P2X7 Receptor Promotes Mouse Mammary Cancer Cell Invasiveness and Tumour Progression, and Is a Target for Anticancer Treatment." *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2342 12 (9): 2342. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12092342>.
- Brisson, Lucie, Osbaldo Lopez-charcas, Bilel Jelassi, David Ternant, Fabrice Trovero, and Pierre Besson. 2020. "Cell Invasiveness and Tumour Progression , and Is a Target for Anticancer Treatment," 1–23.
- Broz, Petr, Pablo Pelegrín, and Feng Shao. 2019. "The Gasdermins, a Protein Family Executing Cell Death and Inflammation." *Nature Reviews Immunology*, November. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0228-2>.
- Brunet, Jean François, François Denizot, Marie Françoise Luciani, Magali Roux-Dosseto, Marie Suzan, Marie Geneviève Mattei, and Pierre Golstein. 1987. "A New Member of the Immunoglobulin Superfamily--CTLA-4." *Nature* 328 (6127): 267–70. <https://doi.org/10.1038/328267A0>.
- Bruzzone, S, L Guida, E Zocchi, L Franco, and Antonio De Flora. 2001. "Connexin 43 Hemi Channels Mediate Ca²⁺-Regulated Transmembrane NAD⁺ Fluxes in Intact Cells." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (1): 10–12. <https://doi.org/10.1096/FJ.00-0566FJE>.
- Bubici, Concetta, and Salvatore Papa. 2014. "JNK Signalling in Cancer: In Need of New, Smarter Therapeutic Targets." *British Journal of Pharmacology* 171 (1): 24–37. <https://doi.org/10.1111/BPH.12432>.
- Buell, G., I.P. Chessell, A.D. Michel, G. Collo, M. Salazzo, S. Herren, D. Gretener, et al. 1998. "Blockade of Human P2X7 Receptor Function With a Monoclonal Antibody." *Blood* 92 (10):

- 3521–28. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V92.10.3521>.
- Buell, Gary N., Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, and Antonarakis SE. 1998. “Gene Structure and Chromosomal Localization of the Human P2X7 Receptor.” *Receptors & Channels* 5 (6): 347–54. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/9826911/>.
- Buisman, H. P., T. H. Steinberg, J. Fischbarg, S. C. Silverstein, S. A. Vogelzang, C. Ince, D. L. Ypey, and P. C.J. Leijh. 1988. “Extracellular ATP Induces a Large Nonselective Conductance in Macrophage Plasma Membranes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (21): 7988–92. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.21.7988>.
- Burnstock, G. 1976. “Purinergic Receptors.” *Journal of Theoretical Biology* 62 (2): 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8).
- Burnstock, G., G. Campbel, D. Satchell, and ANNE Smythe. 1970. “Evidence That Adenosine Triphosphate or a Related Nucleotide Is the Transmitter Substance Released by Non-Adrenergic Inhibitory Nerves in the Gut.” *British Journal of Pharmacology* 40 (4): 668–88. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1970.TB10646.X>.
- Burnstock, G, and C Kennedy. 1985. “Is There a Basis for Distinguishing Two Types of P2-Purinoceptor?” *General Pharmacology* 16 (5): 433–40. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1).
- Burnstock, G, and GE Knight. 2004. “Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems.” *International Review of Cytology* 240 (SPEC.ISS.): 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3).
- Burnstock, Geoffrey. 1990. *Purinergic Receptors-Subclassification and Physiological Roles*.
- . 2006. “Purinergic Signalling.” *British Journal of Pharmacology* 147 (SUPPL. 1): S172–81. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706429>.
- . 2017. “Purinergic Signalling: Therapeutic Developments.” *Frontiers in Pharmacology* 8 (September). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00661>.
- Burnstock, Geoffrey, and Gillian E. Knight. 2004. “Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems.” *International Review of Cytology* 240 (SPEC.ISS.): 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3).
- . 2018. “The Potential of P2X7 Receptors as a Therapeutic Target, Including Inflammation and Tumour Progression.” *Purinergic Signalling* 14 (1). <https://doi.org/10.1007/S11302-017-9593-0>.
- Burnstock, Geoffrey, and Francesco Di Virgilio. 2013. “Purinergic Signalling and Cancer.” *Purinergic Signalling* 9 (4): 491. <https://doi.org/10.1007/S11302-013-9372-5>.

- Cacciari, Barbara, Giorgia Pastorin, Chiara Bolcato, Giampiero Spalluto, Magdalena Bacilieri, and Stefano Moro. 2005. "A2B Adenosine Receptor Antagonists: Recent Developments." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 5 (12): 1053–60. <https://doi.org/10.2174/138955705774933374>.
- Carvalho, Kevin, Elodie Martin, Aurélia Ces, Nadège Sarrazin, Pauline Lagouge-Roussey, Caroline Nous, Leyna Boucherit, et al. 2021. "P2X7-Deficiency Improves Plasticity and Cognitive Abilities in a Mouse Model of Tauopathy." *Progress in Neurobiology* 206 (November): 102139. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2021.102139>.
- Cesaro, Annabelle, Patrick Brest, Véronique Hofman, Xavier Hébuterne, Scott Wildman, Bernard Ferrua, Sandrine Marchetti, et al. 2010. "Amplification Loop of the Inflammatory Process Is Induced by P2X7R Activation in Intestinal Epithelial Cells in Response to Neutrophil Transepithelial Migration." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 299 (1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00282.2009>.
- Charras, G.T. 2008. "A Short History of Blebbing." *Journal of Microscopy* 231 (3): 466–78. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.2008.02059.X>.
- Cheewatrakoolpong, B, H Gilchrest, JC Anthes, and S Greenfeder. 2005. "Identification and Characterization of Splice Variants of the Human P2X7 ATP Channel." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (1): 17–27. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.04.087>.
- Chekeni, FB, MR Elliott, JK Sandilos, SF Walk, JM Kinchen, ER Lazarowski, AJ Armstrong, et al. 2010. "Pannexin 1 Channels Mediate 'find-Me' Signal Release and Membrane Permeability during Apoptosis." *Nature* 467 (7317): 863–67. <https://doi.org/10.1038/NATURE09413>.
- Chen, Guo, Wei Xie, Jihoon Nah, Allan Sauvat, Peng Liu, Federico Pietrocola, Valentina Sica, et al. 2019. "3,4-Dimethoxychalcone Induces Autophagy through Activation of the Transcription Factors TFE3 and TFEB." *EMBO Molecular Medicine* 11 (11). <https://doi.org/10.15252/EMMM.201910469>.
- Chen, Lanfen, and Celia F. Brosnan. 2006. "Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in P2X 7 R $-/-$ Mice: Evidence for Loss of Apoptotic Activity in Lymphocytes ." *The Journal of Immunology* 176 (5): 3115–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3115>.
- Chessell, Iain P., Jonathan P. Hatcher, Chas Bountra, Anton D. Michel, Jane P. Hughes, Paula Green, Julie Egerton, et al. 2005. "Disruption of the P2X7 Purinoceptor Gene Abolishes Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain." *Pain* 114 (3): 386–96. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.01.002>.

- Cicko, Sanja, Thomas Christian Köhler, Cemil Korcan Ayata, Tobias Müller, Nicolas Ehrat, Anja Meyer, Madelon Hossfeld, et al. 2018. "Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X7 Receptor in a LPS Mediated Inflammation (ARDS/ALI)." *Oncotarget* 9 (55): 30635–48. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.25761>.
- Clark, Wallace H., David E. Elder, Dupont Guerry, Leonard E. Braitman, Bruce J. Trock, Delray Schultz, Marie Synnestvedt, and Allan C. Halpern. 1989. "Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression." *Journal of the National Cancer Institute* 81 (24): 1893–1904. <https://doi.org/10.1093/JNCI/81.24.1893>.
- Cockcroft, S., and B. D. Gomperts. 1979. "ATP Induces Nucleotide Permeability in Rat Mast Cells." *Nature* 1979 279:5713 279 (5713): 541–42. <https://doi.org/10.1038/279541A0>.
- Coddou, Claudio, Stanko S. Stojilkovic, and J. Pablo Huidobro-Toro. 2011. "Allosteric Modulation of ATP-Gated P2X Receptor Channels." *Reviews in the Neurosciences* 22 (3): 335–54. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.014/MACHINEREREADABLECITATION/RIS>.
- Coddou, Claudio, Zonghe Yan, Tomas Obsil, J. Pablo Huidobro-Toro, and Stanko S. Stojilkovic. 2011. "Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels." *Pharmacological Reviews* 63 (3): 641–83. <https://doi.org/10.1124/PR.110.003129>.
- Collo, G, S Neidhart, E Kawashima, M Kosco-Vilbois, R A North, and G Buell. 1997. "Tissue Distribution of the P2X7 Receptor" 36 (9): 1277–83.
- Communi, Didier, Nathalie Suarez Gonzalez, Michel Detheux, Sté Phane Bré, Vincent Lannoy, Marc Parmentier, and Jean-Marie Boeynaems. 2001. "Identification of a Novel Human ADP Receptor Coupled to G i *." <https://doi.org/10.1074/jbc.M105912200>.
- Compan, Vincent, Lauriane Ulmann, Olga Stelmashenko, Jean Chemin, Séverine Chaumont, and Francois Rassendren. 2012. "P2X2 and P2X5 Subunits Define a New Heteromeric Receptor with P2X7-Like Properties." *Journal of Neuroscience* 32 (12): 4284–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012>.
- Cotrina, Maria Luisa, and Maiken Nedergaard. 2009. "Physiological and Pathological Functions of P2X7 Receptor in the Spinal Cord." *Purinergic Signalling* 2009 5:2 5 (2): 223–32. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9138-2>.
- Courageot, MP, S Lépine, M Hours, F Giraud, and JC Sulpice. 2004. "Involvement of Sodium in Early Phosphatidylserine Exposure and Phospholipid Scrambling Induced by P2X7 Purinoceptor Activation in Thymocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 21815–23. <https://doi.org/10.1074/JBC.M401426200>.
- Coutinho-Silva, R, L Stahl, MN Raymond, T Jungas, P Verbeke, G Burnstock, T Darville, and DM

- Ojcius. 2003. "Inhibition of Chlamydial Infectious Activity Due to P2X7R-Dependent Phospholipase D Activation." *Immunity* 19 (3): 403–12. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00235-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00235-8).
- Cruz, Cristiane M., Alessandra Rinna, Henry Jay Forman, Ana L.M. Ventura, Pedro M. Persechini, and David M. Ojcius. 2007. "ATP Activates a Reactive Oxygen Species-Dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages." *Journal of Biological Chemistry* 282 (5): 2871–79. <https://doi.org/10.1074/JBC.M608083200>.
- Cruz, Cristiane Monteiro Da, Ana Lúcia Marques Ventura, Julieta Schachter, Helio Miranda Costa, Hercules Antonio Da Silva Souza, Fernanda Ramos Gomes, Robson Coutinho-Silva, David M. Ojcius, and Pedro Muanis Persechini. 2006. "Activation of ERK1/2 by Extracellular Nucleotides in Macrophages Is Mediated by Multiple P2 Receptors Independently of P2X7-Associated Pore or Channel Formation." *British Journal of Pharmacology* 147 (3): 324–34. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706559>.
- Dal Ben, Diego, Michela Buccioni, Catia Lambertucci, Gabriella Marucci, Ajiroghene Thomas, and Rosaria Volpini. 2015. "Purinergic P2X Receptors: Structural Models and Analysis of Ligand-Target Interaction." *European Journal of Medicinal Chemistry* 89 (January): 561–80. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.10.071>.
- Dang, Eric V., Joseph Barbi, Huang Yu Yang, Dilini Jinasena, Hong Yu, Ying Zheng, Zachary Bordman, et al. 2011. "Control of T(H)17/T(Reg) Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1." *Cell* 146 (5): 772–84. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.07.033>.
- Danquah, Welbeck, Meyer Schwesinger Catherine, Björn Rissiek, Carolina Pinto, Serracant Prat Arnau, Miriam Amadi, Domenica Iacenda, et al. 2016. "Nanobodies That Block Gating of the P2X7 Ion Channel Ameliorate Inflammation." *Science Translational Medicine* 8 (366). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>.
- Deaglio, Silvia, Karen M. Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang Fan Chen, et al. 2007. "Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression" 204 (6): 1257–65. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/17502665/>.
- Deaglio, Silvia, and Simon C. Robson. 2011. "Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity." In *Advances in Pharmacology*, 61:301–32. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2>.
- Dell'Antonio, Giacomo, Angelo Quattrini, Elena Dal Cin, Alessandro Fulgenzi, and Maria Elena Ferrero. 2002. "Antinociceptive Effect of a New P2Z/P2X7 Antagonist, Oxidized ATP, in

- Arthritic Rats.” *Neuroscience Letters* 327 (2): 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00385-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00385-3).
- Demeules, Mélanie, Allan Scarpitta, Catalina Abad, Henri Gondé, Romain Hardet, Carolina Pinto-Espinoza, Anna Marei Eichhoff, et al. 2020. “Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using RAAV Vector and Nanobodies (AAVnano).” *Frontiers in Oncology* 10 (September): 1699. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01699/BIBTEX>.
- Deng, Liufu, Hua Liang, Meng Xu, Xuanming Yang, Byron Burnette, Ainhua Arina, Xiao Dong Li, et al. 2014. “STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors.” *Immunity* 41 (5): 843–52. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>.
- Denlinger, Loren C., Philip L. Fisette, Julie A. Sommer, Jyoti J. Watters, Usha Prabhu, George R. Dubyak, Richard A. Proctor, and Paul J. Bertics. 2001. “Cutting Edge: The Nucleotide Receptor P2X7 Contains Multiple Protein- and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (4): 1871–76. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.4.1871>.
- Denlinger, Loren C, Douglas B Coursin, Kathleen Schell, Giuditta Angelini, Dawn N Green, Arturo G Guadarrama, Jennifer Halsey, Usha Prabhu, Kirk J Hogan, and Paul J Bertics. 2006. “Human P2X7 Pore Function Predicts Allele Linkage Disequilibrium.” *Clinical Chemistry* 52 (6): 995–1004. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.065425>.
- Deterre, P, L Gelman, H Gary-Gouy, C Arrieumerlou, V Berthelie, J M Tixier, S Ktorza, J Goding, C Schmitt, and G Bismuth. 1996. “Coordinated Regulation in Human T Cells of Nucleotide-Hydrolyzing Ecto-Enzymatic Activities, Including CD38 and PC-1. Possible Role in the Recycling of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolites.” *The Journal of Immunology* 157 (4).
- Di, Anke, Shiqin Xiong, Zhiming Ye, R.K. Subbarao Malireddi, Satoshi Kometani, Ming Zhong, Manish Mittal, et al. 2018. “The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation.” *Immunity* 49 (1): 56. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.04.032>.
- Díaz-Rodríguez, E, JC Montero, A Esparís-Ogando, L Yuste, and A Pandiella. 2002. “Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylates Tumor Necrosis Factor Alpha-Converting Enzyme at Threonine 735: A Potential Role in Regulated Shedding.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (6): 2031–44. <https://doi.org/10.1091/MBC.01-11-0561>.
- Dinarello, CA. 2009. “Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family.”

- Annual Review of Immunology* 27: 519–50.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132612>.
- Ding, Jingjin, Kun Wang, Wang Liu, Yang She, Qi Sun, Jianjin Shi, Hanzi Sun, Da Cheng Wang, and Feng Shao. 2016. “Pore-Forming Activity and Structural Autoinhibition of the Gasdermin Family.” *Nature* 535 (7610): 111–16. <https://doi.org/10.1038/NATURE18590>.
- Dong, Peixin, Ying Xiong, Junming Yue, Sharon J.B. Hanley, and Hidemichi Watari. 2018. “Tumor-Intrinsic PD-L1 Signaling in Cancer Initiation, Development and Treatment: Beyond Immune Evasion.” *Frontiers in Oncology* 8 (SEP). <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00386>.
- Donnelly-Roberts, Diana L., Marian T. Namovic, Bruce Surber, Srirajan X. Vaidyanathan, Arturo Perez-Medrano, Ying Wang, William A. Carroll, and Michael F. Jarvis. 2009. “[³H]A-804598 ([³H]2-Cyano-1-[(1S)-1-Phenylethyl]-3-Quinolin-5-Ylguanidine) Is a Novel, Potent, and Selective Antagonist Radioligand for P2X7 Receptors.” *Neuropharmacology* 56 (1): 223–29. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.06.012>.
- Donnelly-Roberts, Diana L, Marian T Namovic, Ping Han, and Michael F Jarvis. 2009. “Mammalian P2X7 Receptor Pharmacology: Comparison of Recombinant Mouse, Rat and Human P2X7 Receptors.” *British Journal of Pharmacology* 157 (7): 1203. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00233.X>.
- Douguet, Laetitia, Serena Janho dit Hreich, Jonathan Benzaquen, Laetitia Seguin, Thierry Juhel, Xavier Dezitter, Christophe Duranton, et al. 2021. “A Small-Molecule P2RX7 Activator Promotes Anti-Tumor Immune Responses and Sensitizes Lung Tumor to Immunotherapy.” *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-20912-2>.
- Drill, Matthew, Nigel C. Jones, Martin Hunn, Terence J. O’Brien, and Mastura Monif. 2021. “Antagonism of the ATP-Gated P2X7 Receptor: A Potential Therapeutic Strategy for Cancer.” *Purinergic Signalling* 17 (2): 215. <https://doi.org/10.1007/S11302-021-09776-9>.
- Duncan, JA, DT Bergstralh, Y Wang, SB Willingham, Z Ye, AG Zimmermann, and JP Ting. 2007. “Cryopyrin/NALP3 Binds ATP/DATP, Is an ATPase, and Requires ATP Binding to Mediate Inflammatory Signaling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (19): 8041–46. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0611496104>.
- Dwyer, Karen M., Silvia Deaglio, Wenda Gao, David Friedman, Terry B. Strom, and Simon C. Robson. 2007. “CD39 and Control of Cellular Immune Responses.” *Purinergic Signalling* 3 (1–2): 171. <https://doi.org/10.1007/S11302-006-9050-Y>.
- Eichhoff, Anna Marei, Kathleen Börner, Birte Albrecht, Waldemar Schäfer, Natalie Baum, Friedrich Haag, Jakob Körbelin, et al. 2019. “No Title.” *Molecular Therapy - Methods & Clinical*

- Development* 15 (December): 211–20. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.003>.
- El-Moatassim, C., and G. R. Dubyak. 1992. “A Novel Pathway for the Activation of Phospholipase D by P2z Purinergic Receptors in BAC1.2F5 Macrophages.” *Journal of Biological Chemistry* 267 (33): 23664–73. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35890-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35890-3).
- Elliott, James I., Annmarie Surprenant, Federica M. Marelli-Berg, Joanne C. Cooper, Robin L. Cassady-Cain, Carol Wooding, Kenneth Linton, Denis R. Alexander, and Christopher F. Higgins. 2005. “Membrane Phosphatidylserine Distribution as a Non-Apoptotic Signalling Mechanism in Lymphocytes.” *Nature Cell Biology* 2005 7:8 7 (8): 808–16. <https://doi.org/10.1038/NCB1279>.
- Elliott, Michael R., Faraaz B. Cheken, Paul C. Trampont, Eduardo R. Lazarowski, Alexandra Kadl, Scott F. Walk, Daeho Park, et al. 2009. “Nucleotides Released by Apoptotic Cells Act as a Find-Me Signal to Promote Phagocytic Clearance.” *Nature* 461 (7261): 282–86. <https://doi.org/10.1038/nature08296>.
- Elsas, Andrea Van, Arthur A. Hurwitz, and James P. Allison. 1999. “Combination Immunotherapy of B16 Melanoma Using Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)-Producing Vaccines Induces Rejection of Subcutaneous and Metastatic Tumors Accompanied by Autoimmune Depigmentation.” *The Journal of Experimental Medicine* 190 (3): 355–66. <https://doi.org/10.1084/JEM.190.3.355>.
- Eltzschig, Holger K., David Köhler, Tobias Eckle, Tianqing Kong, Simon C. Robson, and Sean P. Colgan. 2009. “Central Role of Sp1-Regulated CD39 in Hypoxia/Ischemia Protection.” *Blood* 113 (1): 224. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-06-165746>.
- Evans, R. J. 2009. “Orthosteric and Allosteric Binding Sites of P2X Receptors.” *European Biophysics Journal* 38 (3): 319–27. <https://doi.org/10.1007/S00249-008-0275-2/TABLES/1>.
- Fairbairn, Ian P., Carmel B. Stober, Dinakantha S. Kumararatne, and David A. Lammas. 2001. “ATP-Mediated Killing of Intracellular Mycobacteria by Macrophages Is a P2X7-Dependent Process Inducing Bacterial Death by Phagosome-Lysosome Fusion.” *The Journal of Immunology* 167 (6): 3300–3307. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.6.3300>.
- Faliti, Caterina E., Roberta Gualtierotti, Elsa Rottoli, Maria Gerosa, Lisa Perruzza, Andrea Romagnani, Giovanni Pellegrini, et al. 2019. “P2X7 Receptor Restrains Pathogenic Tfh Cell Generation in Systemic Lupus Erythematosus.” *Journal of Experimental Medicine* 216 (2): 317–36. <https://doi.org/10.1084/jem.20171976>.
- Fang, Tao, Xiaotang Lu, Daniel Berger, Christina Gmeiner, Julia Cho, Richard Schalek, Hidde

- Ploegh, and Jeff Lichtman. 2018. "Nanobody Immunostaining for Correlated Light and Electron Microscopy with Preservation of Ultrastructure." *Nature Methods* 15 (12): 1029–32. <https://doi.org/10.1038/S41592-018-0177-X>.
- Feng, Lili, Xiaofeng Sun, Eva Csizmadia, Lihui Han, Shu Bian, Takashi Murakami, Xin Wang, Simon C. Robson, and Yan Wu. 2011. "Vascular CD39/ENTPD1 Directly Promotes Tumor Cell Growth by Scavenging Extracellular Adenosine Triphosphate." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 13 (3): 206. <https://doi.org/10.1593/NEO.101332>.
- Feng, Ying-Hong, Xin Li, Liqin Wang, Lingying Zhou, and George I. Gorodeski. 2006. "A Truncated P2X7 Receptor Variant (P2X7-j) Endogenously Expressed in Cervical Cancer Cells Antagonizes the Full-Length P2X7 Receptor through Hetero-Oligomerization." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (25): 17228. <https://doi.org/10.1074/JBC.M602999200>.
- Fernández, Dominique, Felipe Flores-Santibáñez, Jocelyn Neira, Francisco Osorio-Barrios, Gabriela Tejón, Sarah Nuñez, Yessia Hidalgo, et al. 2016. "Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity." *PloS One* 11 (6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157889>.
- Ferrari, D., C. Pizzirani, S. Gulinelli, G. Callegari, P. Chiozzi, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2007. "Modulation of P2X7 Receptor Functions by Polymyxin B: Crucial Role of the Hydrophobic Tail of the Antibiotic Molecule." *British Journal of Pharmacology* 150 (4): 445–54. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706994>.
- Ferrari, D, P Chiozzi, S Falzoni, M Dal Susino, G Collo, G Buell, and F Di Virgilio. 1997. "ATP-Mediated Cytotoxicity in Microglial Cells." *Neuropharmacology* 36 (9): 1295–1301. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00137-8).
- Ferrari, D, S Wesselborg, MK Bauer, and K Schulze-Osthoff. 1997. "Extracellular ATP Activates Transcription Factor NF-KappaB through the P2Z Purinoreceptor by Selectively Targeting NF-KappaB P65." *The Journal of Cell Biology* 139 (7): 1635–43. <https://doi.org/10.1083/JCB.139.7.1635>.
- Ferrari, Davide, Marco Idzko, Stefan Dichmann, Daniela Purlis, Christian Virchow, Johannes Norgauer, Paola Chiozzi, Francesco Di Virgilio, and Werner Luttmann. 2000. "P2 Purinergic Receptors of Human Eosinophils: Characterization and Coupling to Oxygen Radical Production." *FEBS Letters* 486 (3): 217–24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02306-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02306-1).
- Ferrari, Davide, Andrea La Sala, Paola Chiozzi, Anna Morelli, Simonetta Falzoni, Giampiero Girolomoni, Marco Idzko, Stefan Dichmann, Johannes Norgauer, and Francesco Di Virgilio. 2000. "The P2 Purinergic Receptors of Human Dendritic Cells: Identification and Coupling to Cytokine Release." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American*

- Societies for Experimental Biology* 14 (15): 2466–76. <https://doi.org/10.1096/FJ.00-0031COM>.
- Ferrari, Davide, Sebastian Wesselborg, Manuel K.A. Bauer, and Klaus Schulze-Osthoff. 1997. “Extracellular ATP Activates Transcription Factor NF-KB through the P2Z Purinoreceptor by Selectively Targeting NF-KB P65 (RelA).” *Journal of Cell Biology* 139 (7): 1635–43. <https://doi.org/10.1083/JCB.139.7.1635>.
- Flittiger, B., M. Klapperstück, G. Schmalzing, and F. Markwardt. 2010. “Effects of Protons on Macroscopic and Single-Channel Currents Mediated by the Human P2X7 Receptor.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798 (5): 947–57. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2010.01.023>.
- Forrester, T., and Carole A. Williams. 1977. “Release of Adenosine Triphosphate from Isolated Adult Heart Cells in Response to Hypoxia.” *The Journal of Physiology* 268 (2): 371–90. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1977.SP011862>.
- Foster, JG, E Carter, I Kilty, AB MacKenzie, and SG Ward. 2013. “Mitochondrial Superoxide Generation Enhances P2X7R-Mediated Loss of Cell Surface CD62L on Naive Human CD4+ T Lymphocytes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (4): 1551–59. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1201510>.
- Fran, Françoise, Françoise Wilkin, Patrick Stordeur, Michel Goldman, Jean-Marie Boeynaems, and Bernard Robaye. 2002. “Extracellular Adenine Nucleotides Modulate Cytokine Production by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: Dual Effect on IL-12 and Stimulation of IL-10.”
- Franceschini, Alessia, Marina Capece, Paola Chiozzi, Simonetta Falzoni, Juana Maria Sanz, Alba Clara Sarti, Massimo Bonora, Paolo Pinton, and Francesco Di Virgilio. 2015. “The P2X7 Receptor Directly Interacts with the NLRP3 Inflammasome Scaffold Protein.” *The FASEB Journal* 29 (6): 2450–61. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-268714>.
- Franchi, L, N Warner, K Viani, and G Nuñez. 2009. “Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense.” *Immunological Reviews* 227 (1): 106–28. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2008.00734.X>.
- Fredholm, Bertil, Rodrigo Cunha, and Per Svenningsson. 2003. “Pharmacology of Adenosine A2A Receptors and Therapeutic Applications.” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3 (4): 413–26. <https://doi.org/10.2174/1568026033392200>.
- Freeman, Gordon J., Andrew J. Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J. Fitz, et al. 2000. “Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation.” *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027–34. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.7.1027>.

- Friedle, Scott A., Marjorie A. Curet, and Jyoti J. Watters. 2010. "Recent Patents on Novel P2x7 Receptor Antagonists and Their Potential for Reducing Central Nervous System Inflammation." *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 5 (1): 35–45.
<https://doi.org/10.2174/157488910789753530>.
- Fu, Haiyan, Joseph Muenzer, Richard J. Samulski, George Breese, Jerillyn Sifford, Xinhua Zeng, and Douglas M. McCarty. 2003. "Self-Complementary Adeno-Associated Virus Serotype 2 Vector: Global Distribution and Broad Dispersion of AAV-Mediated Transgene Expression in Mouse Brain." *Molecular Therapy* 8 (6): 911–17. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2003.08.021>.
- Fuller, Stephen J., Leanne Stokes, Kristen K. Skarratt, Ben J. Gu, and James S. Wiley. 2009. "Genetics of the P2X7 Receptor and Human Disease." *Purinergic Signalling* 5 (2): 257.
<https://doi.org/10.1007/S11302-009-9136-4>.
- Furini, Federica, Anna Lisa Giuliani, Mattia Erminio Parlati, Marcello Govoni, Francesco Di Virgilio, and Alessandra Bortoluzzi. 2019. "P2X7 Receptor Expression in Patients with Serositis Related to Systemic Lupus Erythematosus." *Frontiers in Pharmacology* 10 (APR): 435.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00435/BIBTEX>.
- Furlan-Freguia, Christian, Patrizia Marchese, András Gruber, Zaverio M. Ruggeri, and Wolfram Ruf. 2011. "P2X7 Receptor Signaling Contributes to Tissue Factor-Dependent Thrombosis in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2932–44. <https://doi.org/10.1172/JCI46129>.
- Galluzzi, Lorenzo, Aitziber Buqué, Oliver Kepp, Laurence Zitvogel, and Guido Kroemer. 2017. "Immunogenic Cell Death in Cancer and Infectious Disease." *Nature Reviews. Immunology* 17 (2): 97–111. <https://doi.org/10.1038/NRI.2016.107>.
- Gao, Guang Ping, Mauricio R. Alvira, Lili Wang, Roberto Calcedo, Jule Johnston, and James M. Wilson. 2002. "Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11854–59. <https://doi.org/10.1073/PNAS.182412299>.
- Gao, Guangping, Luk H. Vandenberghe, Mauricio R. Alvira, You Lu, Roberto Calcedo, Xiangyang Zhou, and James M. Wilson. 2004. "Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues." *Journal of Virology* 78 (12): 6381–88.
<https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6381-6388.2004>.
- Garavaglia, Silvia, Santina Bruzzone, Camilla Cassani, Laura Canella, Gianna Allegrone, Laura Sturla, Elena Mannino, Enrico Millo, Antonio De Flora, and Menico Rizzi. 2012. "The High-Resolution Crystal Structure of Periplasmic Haemophilus Influenzae NAD Nucleotidase Reveals a Novel Enzymatic Function of Human CD73 Related to NAD Metabolism." *The Biochemical*

Journal 441 (1): 131–41. <https://doi.org/10.1042/BJ20111263>.

Garbers, Christoph, Nathalie Jänner, Athena Chalaris, Marcia L. Moss, Doreen M. Floss, Dörte Meyer, Friedrich Koch-Nolte, Stefan Rose-John, and Jürgen Scheller. 2011. “Species Specificity of ADAM10 and ADAM17 Proteins in Interleukin-6 (IL-6) Trans-Signaling and Novel Role of ADAM10 in Inducible IL-6 Receptor Shedding.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 14804–11. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.229393>.

Garcia-Diaz, Angel, Daniel Sanghoon Shin, Blanca Homet Moreno, Justin Saco, Helena Escuin-Ordinas, Gabriel Abril Rodriguez, Jesse M. Zaretsky, et al. 2017. “Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression.” *Cell Reports* 19 (6): 1189. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.04.031>.

Garg, A. D., S. Martin, J. Golab, and P. Agostinis. 2014. “Danger Signalling during Cancer Cell Death: Origins, Plasticity and Regulation.” *Cell Death and Differentiation* 21 (1): 26–38. <https://doi.org/10.1038/CDD.2013.48>.

Gargett, Cornish, and James S. Wiley. 1996. “Phospholipase D Activation by P2Z-Purinoceptor Agonists in Human Lymphocytes Is Dependent on Bivalent Cation Influx.” *The Biochemical Journal* 313 (Pt 2 (Pt 2): 529–35. <https://doi.org/10.1042/BJ3130529>.

Geoghegan, James C., Gundo Diedrich, Xiaojun Lu, Kim Rosenthal, Kris F. Sachsenmeier, Herren Wu, William F. Dall’Acqua, and Melissa M. Damschroder. 2016. “Inhibition of CD73 AMP Hydrolysis by a Therapeutic Antibody with a Dual, Non-Competitive Mechanism of Action.” *MAbs* 8 (3): 454–67. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1143182>.

Ghetie, Victor, Serguei Popov, Jozef Borvak, Caius Radu, Diana Matesoi, Corneliu Medesan, Raimund J. Ober, and E. Sally Ward. 1997. “Increasing the Serum Persistence of an IgG Fragment by Random Mutagenesis.” *Nature Biotechnology* 15 (7): 637–40. <https://doi.org/10.1038/NBT0797-637>.

Ghiringhelli, François, Lionel Apetoh, Antoine Tesniere, Laetitia Aymeric, Yuting Ma, Carla Ortiz, Karim Vermaelen, et al. 2009. “Activation of the NLRP3 Inflammasome in Dendritic Cells Induces IL-1B-Dependent Adaptive Immunity against Tumors.” *Nature Medicine* 15 (10): 1170–78. <https://doi.org/10.1038/nm.2028>.

Gilbert, Sm, Cj Oliphant, S. Hassan, Al Peille, P. Bronsert, S. Falzoni, F. Di Virgilio, S. McNulty, and R. Lara. 2019. “ATP in the Tumour Microenvironment Drives Expression of NfP2X 7 , a Key Mediator of Cancer Cell Survival.” *Oncogene* 38 (2). <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0426-6>.

Giraudon Paoli, Marc, Severine Augier, Marilyne Royannez Blemont, Céline Rodriguez, Hélène

- Rispaud Blanc, Stéphanie Chanteux, Nicolas Gourdin, et al. 2016. “Abstract 2344: Discovery and Characterization of New Original Blocking Antibodies Targeting the CD73 Immune Checkpoint for Cancer Immunotherapy.” *Cancer Research* 76 (14_Supplement): 2344–2344. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-2344>.
- Giuliani, Anna Lisa, Alba Clara Sarti, and Francesco Di Virgilio. 2019. “Extracellular Nucleotides and Nucleosides as Signalling Molecules.” *Immunology Letters* 205 (January): 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2018.11.006>.
- . 2021. “Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation.” *Frontiers in Pharmacology* 11 (February): 2419. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.619458/BIBTEX>.
- Goldszmid, Romina S., Amiran Dzutsev, and Giorgio Trinchieri. 2014. “Host Immune Response to Infection and Cancer: Unexpected Commonalities.” *Cell Host & Microbe* 15 (3): 295–305. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2014.02.003>.
- Gomperts, B. D. 1983. “Involvement of Guanine Nucleotide-Binding Protein in the Gating of Ca²⁺ by Receptors.” *Nature* 1983 306:5938 306 (5938): 64–66. <https://doi.org/10.1038/306064A0>.
- Gonnord, P., C. Delarasse, R. Auger, K. Benihoud, M. Prigent, M. H. Cuif, C. Lamaze, and J. M. Kanellopoulos. 2009. “Palmitoylation of the P2X7 Receptor, an ATP-Gated Channel, Controls Its Expression and Association with Lipid Rafts.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (3): 795–805. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-114637>.
- Gordon. 1986. “Extracellular ATP: Effects, Sources and Fate.” *The Biochemical Journal* 233 (2): 309–19. <https://doi.org/10.1042/BJ2330309>.
- Grassi, Fabio, and Benedetta De Ponte Conti. 2021. “The P2X7 Receptor in Tumor Immunity.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (June). <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.694831>.
- Greenberg, Andrew S., David Avila, Marianne Hughes, Austin Hughes, E. Churchill McKinney, and Martin F. Flajnik. 1995. “A New Antigen Receptor Gene Family That Undergoes Rearrangement and Extensive Somatic Diversification in Sharks.” *Nature* 374 (6518): 168–73. <https://doi.org/10.1038/374168A0>.
- Grigoriou-Serbanescu, Maria, Stefan Herms, Thomas W. Mühleisen, Alexander Georgi, Carmen C. Diaconu, Jana Strohmaier, Piotr Czerski, et al. 2009. “Variation in P2RX7 Candidate Gene (Rs2230912) Is Not Associated with Bipolar I Disorder and Unipolar Major Depression in Four European Samples.” *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 150B (7): 1017–21. <https://doi.org/10.1002/AJMG.B.30952>.

- Grimm, Dirk, Kusum Pandey, Hiroyuki Nakai, Theresa A. Storm, and Mark A. Kay. 2006. "Liver Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus Is Primarily Restricted by Capsid Serotype Not Vector Genotype." *Journal of Virology* 80 (1): 426–39.
<https://doi.org/10.1128/JVI.80.1.426-439.2006>.
- Grimm, Dirk, Shangzhon Zhou, Hiroyuki Nakai, Clare E. Thomas, Theresa A. Storm, Sally Fuess, Takashi Matsushita, et al. 2003. "Preclinical in Vivo Evaluation of Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors for Liver Gene Therapy." *Blood* 102 (7): 2412–19.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-02-0495>.
- Gross, O, H Poeck, M Bscheider, C Dostert, N Hanneschläger, S Endres, G Hartmann, et al. 2009. "Syk Kinase Signalling Couples to the Nlrp3 Inflammasome for Anti-Fungal Host Defence." *Nature* 459 (7245): 433–36. <https://doi.org/10.1038/NATURE07965>.
- Grötzinger, J, I Lorenzen, and S Düsterhöft. 2017. "Molecular Insights into the Multilayered Regulation of ADAM17: The Role of the Extracellular Region." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864 (11 Pt B): 2088–95.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.05.024>.
- Gu, B. J., W. Y. Zhang, L. J. Bendall, I. P. Chessell, G. N. Buell, and J. S. Wiley. 2000. "Expression of P2X7 Purinoceptors on Human Lymphocytes and Monocytes: Evidence for Nonfunctional P2X7 Receptors." *Https://Doi-Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1152/Ajpcell.2000.279.4.C1189* 279 (4 48-4): 1189–97.
<https://doi.org/10.1152/AJPCELL.2000.279.4.C1189>.
- Gu, Ben J., Weiyi Zhang, Rebecca A. Worthington, Ronald Sluyter, Phuong Dao-Ung, Steven Petrou, Julian A. Barden, and James S. Wiley. 2001. "A Glu-496 to Ala Polymorphism Leads to Loss of Function of the Human P2X7 Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 276 (14): 11135–42.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M010353200>.
- Gu, Li Qun, Feng Ying Li, Lin Zhao, Yun Liu, Qian Chu, Xun Xiong Zang, Jian Min Liu, Guang Ning, and Yong Ju Zhao. 2010. "Association of XIAP and P2X7 Receptor Expression with Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma." *Endocrine* 38 (2): 276–82.
<https://doi.org/10.1007/S12020-010-9384-7>.
- Guile, Simon D., Lilian Alcaraz, Timothy N. Birkinshaw, Keith C. Bowers, Mark R. Ebden, Mark Furber, and Michael J. Stocks. 2009. "Antagonists of the P2X7 Receptor. From Lead Identification to Drug Development." *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (10): 3123–41.
<https://doi.org/10.1021/JM801528X>.
- Gunosewoyo, Hendra, and Michael Kassiou. 2010. "P2X Purinergic Receptor Ligands: Recently

- Patented Compounds.” *Http://Dx.Doi.Org/10.1517/13543771003702424* 20 (5): 625–46.
<https://doi.org/10.1517/13543771003702424>.
- Gurusamy, Devikala, Amanda N. Henning, Tori N. Yamamoto, Zhiya Yu, Nikolaos Zacharakis, Sri Krishna, Rigel J. Kishton, et al. 2020. “Multi-Phenotype CRISPR-Cas9 Screen Identifies P38 Kinase as a Target for Adoptive Immunotherapies.” *Cancer Cell* 37 (6): 818-833.e9.
<https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.05.004>.
- Guzman-Aranguéz, A, MJ Pérez de Lara, and J Pintor. 2017. “Hyperosmotic Stress Induces ATP Release and Changes in P2X7 Receptor Levels in Human Corneal and Conjunctival Epithelial Cells.” *Purinergic Signalling* 13 (2): 249–58. <https://doi.org/10.1007/S11302-017-9556-5>.
- Haag, Friedrich, Sahil Adriouch, Anette Braß, Caroline Jung, Sina Möller, Felix Scheuplein, Peter Bannas, Michel Seman, and Friedrich Koch-Nolte. 2007a. *Extracellular NAD and ATP: Partners in Immune Cell Modulation. Purinergic Signalling*. Vol. 3. Springer.
<https://doi.org/10.1007/s11302-006-9038-7>.
- . 2007b. “Extracellular NAD and ATP: Partners in Immune Cell Modulation.” *Purinergic Signalling* 3 (1–2): 71–81. <https://doi.org/10.1007/S11302-006-9038-7/FIGURES/3>.
- Haanes, Kristian A., Albrecht Schwab, and Ivana Novak. 2012. “The P2X7 Receptor Supports Both Life and Death in Fibrogenic Pancreatic Stellate Cells.” *PLOS ONE* 7 (12): e51164.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051164>.
- Hajnóczky, Robb-Gaspers, Seitz MB, and Thomas AP. 1995. “Decoding of Cytosolic Calcium Oscillations in the Mitochondria.” *Cell* 82 (3): 415–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90430-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90430-1).
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hammers, E. Bajjiana Songa, N. Bendahman, and R. Hammers. 1993. “Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains.” *Nature* 1993 363:6428 363 (6428): 446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Harkat, Mahboubi, Laurie Peverini, Adrien H. Cerdan, Kate Dunning, Juline Beudez, Adeline Martz, Nicolas Calimet, et al. 2017. “On the Permeation of Large Organic Cations through the Pore of ATP-Gated P2X Receptors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (19): E3786–95. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1701379114>.
- Hashimoto-Hill, S., L. Friesen, M. Kim, and C. H. Kim. 2017. “Contraction of Intestinal Effector T Cells by Retinoic Acid-Induced Purinergic Receptor P2X7.” *Mucosal Immunology* 10 (4): 912–23. <https://doi.org/10.1038/MI.2016.109>.
- Hatfield, Stephen M., Jorgen Kjaergaard, Dmitriy Lukashev, Bryan Belikoff, Taylor H. Schreiber, Shalini Sethumadhavan, Robert Abbott, et al. 2014. “Systemic Oxygenation Weakens the

- Hypoxia and Hypoxia Inducible Factor 1 α -Dependent and Extracellular Adenosine-Mediated Tumor Protection.” *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 92 (12): 1283–92. <https://doi.org/10.1007/S00109-014-1189-3>.
- Hattori, Fumie, Yasuhiro Ohshima, Shizuka Seki, Mitsutoshi Tsukimoto, Mitsuru Sato, Takato Takenouchi, Akina Suzuki, et al. 2012. “Feasibility Study of B16 Melanoma Therapy Using Oxidized ATP to Target Purinergic Receptor P2X7.” *European Journal of Pharmacology* 695 (1–3): 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.09.001>.
- Hattori, Motoyuki, and Eric Gouaux. 2012. “Molecular Mechanism of ATP Binding and Ion Channel Activation in P2X Receptors.” *Nature* 485 (7397): 207. <https://doi.org/10.1038/NATURE11010>.
- Hay, Carl M., Erin Sult, Qihui Huang, Kathy Mulgrew, Stacy R. Fuhrmann, Kelly A. McGlinchey, Scott A. Hammond, et al. 2016. “Targeting CD73 in the Tumor Microenvironment with MEDI9447.” *Oncoimmunology* 5 (8). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1208875>.
- He, Wan-ting Ting, Haoqiang Wan, Lichen Hu, Pengda Chen, Xin Wang, Zhe Huang, Zhang-Hua Hua Yang, Chuan-Qi Qi Zhong, and Jiahuai Han. 2015. “Gasdermin D Is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1 β Secretion” 25 (12): 1285–98. <https://doi.org/10.1038/CR.2015.139>.
- Hibell, A. D., E. J. Kidd, I. P. Chessell, P. P.A. Humphrey, and A. D. Michel. 2000. “Apparent Species Differences in the Kinetic Properties of P2X7 Receptors.” *British Journal of Pharmacology* 130 (1): 167–73. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703302>.
- Hibell, A. D., K. M. Thompson, J. Simon, M. Xing, P. P.A. Humphrey, and A. D. Michel. 2001. “Species- and Agonist-Dependent Differences in the Deactivation-Kinetics of P2X7 Receptors.” *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 2001 363:6 363 (6): 639–48. <https://doi.org/10.1007/S002100100412>.
- Hilchey, Shannon P., James J. Kobie, Mathew R. Cochran, Shelley Secor-Socha, Jyh-Chiang E. Wang, Ollivier Hyrien, W. Richard Burack, Tim R. Mosmann, Sally A. Quataert, and Steven H. Bernstein. 2009. “Human Follicular Lymphoma CD39+-Infiltrating T Cells Contribute to Adenosine-Mediated T Cell Hyporesponsiveness.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (10): 6157–66. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900475>.
- Hirano, Fumiya, Katsumi Kaneko, Hideto Tamura, Haidong Dong, Shengdian Wang, Masao Ichikawa, Cecilia Rietz, et al. 2005. “Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity.” *Cancer Research* 65 (3): 1089–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.1089.65.3>.
- Hofman, Paul, Julien Cherfils-Vicini, Marie Bazin, Marius Ilie, Thierry Juhel, Xavier Hébuterne, Eric

- Gilson, et al. 2015. "Genetic and Pharmacological Inactivation of the Purinergic P2RX7 Receptor Dampens Inflammation but Increases Tumor Incidence in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer." *Cancer Research* 75 (5): 835–45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1778>.
- Holland, M. C., J. U. Wurthner, P. J. Morley, M. A. Birchler, J. Lambert, M. Albayaty, A. P. Serone, et al. 2013. "Autoantibodies to Variable Heavy (VH) Chain Ig Sequences in Humans Impact the Safety and Clinical Pharmacology of a VH Domain Antibody Antagonist of TNF- α Receptor 1." *Journal of Clinical Immunology* 33 (7): 1192–1203. <https://doi.org/10.1007/S10875-013-9915-0>.
- Homolya, L, TH Steinberg, and RC Boucher. 2000. "Cell to Cell Communication in Response to Mechanical Stress via Bilateral Release of ATP and UTP in Polarized Epithelia." *The Journal of Cell Biology* 150 (6): 1349–59. <https://doi.org/10.1083/JCB.150.6.1349>.
- Honore, Prisca, Diana Donnelly-Roberts, Marian T. Namovic, Gin Hsieh, Chang Z. Zhu, Joe P. Mikusa, Gricelda Hernandez, et al. 2006. "A-740003 [N-(1-[(Cyanoimino)(5-Quinolinylamino) Methyl]Amino}-2,2-Dimethylpropyl)-2-(3,4-Dimethoxyphenyl)Acetamide], a Novel and Selective P2X7 Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319 (3): 1376–85. <https://doi.org/10.1124/JPET.106.111559>.
- Horváth, Gergely, Lilla Otrókoci, Katinka Beko, Mária Baranyi, Ágnes Kittel, Pablo Antonio Fritz-Ruenes, and Beáta Sperlág. 2019. "P2X7 Receptors Drive Poly(I:C) Induced Autism-like Behavior in Mice." *Journal of Neuroscience* 39 (13): 2542–61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1895-18.2019>.
- Hu, Hongbo, Baohui Yang, Yumin Li, Subin Zhang, and Zheng Li. 2016. "Blocking of the P2X7 Receptor Inhibits the Activation of the MMP-13 and NF-KB Pathways in the Cartilage Tissue of Rats with Osteoarthritis." *International Journal of Molecular Medicine* 38 (6): 1922–32. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2016.2770>.
- Hubert, Sandra, Björn Rissiek, Katjana Klages, Jochen Huehn, Tim Sparwasser, Friedrich Haag, Friedrich Koch-Nolte, Olivier Boyer, Michel Seman, and Sahil Adriouch. 2010. "Extracellular NAD⁺ Shapes the Foxp3⁺ Regulatory T Cell Compartment through the ART2-P2X7 Pathway." *Journal of Experimental Medicine* 207 (12): 2561–68. <https://doi.org/10.1084/jem.20091154>.
- Humphreys, BD, J Rice, SB Kertesz, and GR Dubyak. 2000. "Stress-Activated Protein Kinase/JNK Activation and Apoptotic Induction by the Macrophage P2X7 Nucleotide Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 26792–98. <https://doi.org/10.1074/JBC.M002770200>.
- Idzko, Marco, Stefan Dichmann, Davide Ferrari, Francesco Di Virgilio, Andrea La Sala, Giampiero

- Girolomoni, Elisabeth Panther, and Johannes Norquæ. 2002. "Nucleotides Induce Chemotaxis and Actin Polymerization in Immature but Not Mature Human Dendritic Cells via Activation of Pertussis Toxin–Sensitive P2y Receptors." *Blood* 100 (3): 925–32. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.3.925>.
- Idzko, Marco, Hamida Hammad, Menno Van Nimwegen, Mirjam Kool, Monique A.M. Willart, Femke Muskens, Henk C. Hoogsteden, et al. 2007. "Extracellular ATP Triggers and Maintains Asthmatic Airway Inflammation by Activating Dendritic Cells." *Nature Medicine* 2007 13:8 13 (8): 913–19. <https://doi.org/10.1038/nm1617>.
- Ingram, Jessica R., Michael Dougan, Mohammad Rashidian, Marko Knoll, Edmund J. Keliher, Sarah Garrett, Scott Garforth, et al. 2017. "PD-L1 Is an Activation-Independent Marker of Brown Adipocytes." *Nature Communications* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00799-8>.
- Inoue, Kazuhide, and Makoto Tsuda. 2021. "Nociceptive Signaling Mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 Receptors." *Biochemical Pharmacology* 187 (May): 114309. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2020.114309>.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. "Induced Expression of PD-1, a Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, upon Programmed Cell Death." *The EMBO Journal* 11 (11): 3887–95. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05481.X>.
- Iwai, Yoshiko, Masayoshi Ishida, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Nagahiro Minato. 2002. "Involvement of PD-L1 on Tumor Cells in the Escape from Host Immune System and Tumor Immunotherapy by PD-L1 Blockade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19): 12293–97. <https://doi.org/10.1073/PNAS.192461099>.
- Jackson, Shaun W., Tomokazu Hoshi, Yan Wu, Xiaofeng Sun, Keiichi Enjyoji, Eva Cszimadia, Christian Sundberg, and Simon C. Robson. 2007. "Disordered Purinergic Signaling Inhibits Pathological Angiogenesis in Cd39/Entpd1-Null Mice." *The American Journal of Pathology* 171 (4): 1395. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2007.070190>.
- Jiang, Lin-Hua, Jocelyn Baldwin, Sébastien Roger, and Stephen Baldwin. 2013. "Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms." *Frontiers in Pharmacology* 0: 55. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2013.00055>.
- Jiang, Z. Gordon, Yan Wu, Eva Cszimadia, Linda Feldbrügge, Keiichi Enjyoji, John Tigges, Vasilis Toxavidis, et al. 2014. "Characterization of Circulating Microparticle-Associated CD39 Family Ecto-Nucleotidases in Human Plasma." *Purinergic Signalling* 10 (4): 611–18.

<https://doi.org/10.1007/S11302-014-9423-6>.

- Jin, Dachuan, Jie Fan, Long Wang, Linda F. Thompson, Aijie Liu, Benjamin J. Daniel, Tahiro Shin, Tyler J. Curiel, and Bin Zhang. 2010. “CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression.” *Cancer Research* 70 (6): 2245–55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3109/655773/P/CD73-ON-TUMOR-CELLS-IMPAIRS-ANTITUMOR-T-CELL>.
- Jouaville, LS, P Pinton, C Bastianutto, GA Rutter, and R Rizzuto. 1999. “Regulation of Mitochondrial ATP Synthesis by Calcium: Evidence for a Long-Term Metabolic Priming.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24): 13807–12. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13807>.
- Junger, Wolfgang G. 2011. “Immune Cell Regulation by Autocrine Purinergic Signalling.” *Nature Reviews. Immunology* 11 (3): 201–12. <https://doi.org/10.1038/NRI2938>.
- Kaczmarek-Hajek, Karina, Jiong Zhang, Robin Kopp, Antje Grosche, Björn Rissiek, Anika Saul, Santina Bruzzone, et al. 2018. “Re-Evaluation of Neuronal P2X7 Expression Using Novel Mouse Models and a P2X7-Specific Nanobody.” *ELife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36217>.
- Karasawa, A, K Michalski, P Mikhelzon, and T Kawate. 2017. “The P2X7 Receptor Forms a Dye-Permeable Pore Independent of Its Intracellular Domain but Dependent on Membrane Lipid Composition.” *ELife* 6 (September). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.31186>.
- Karasawa, Akira, and Toshimitsu Kawate. 2016. “Structural Basis for Subtype-Specific Inhibition of the P2X7 Receptor.” *ELife* 5 (DECEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.22153>.
- Kawate, Toshimitsu, Jennifer Carlisle Michel, William T. Birdsong, and Eric Gouaux. 2009. “Crystal Structure of the ATP-Gated P2X4 Ion Channel in the Closed State.” *Nature* 460 (7255): 592. <https://doi.org/10.1038/NATURE08198>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O’Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, et al. 2015. “Caspase-11 Cleaves Gasdermin D for Non-Canonical Inflammasome Signalling.” *Nature* 526 (7575): 666–71. <https://doi.org/10.1038/NATURE15541>.
- Kepp, Oliver, Lucillia Bezu, Takahiro Yamazaki, Francesco Di Virgilio, Mark J Smyth, Guido Kroemer, and Lorenzo Galluzzi. 2021. “ATP and Cancer Immunosurveillance.” *The EMBO Journal* 40 (13): e108130. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108130>.
- Kepp, Oliver, Friedemann Loos, Peng Liu, and Guido Kroemer. 2017. “Extracellular Nucleosides and Nucleotides as Immunomodulators.” *Immunological Reviews* 280 (1): 83–92. <https://doi.org/10.1111/IMR.12571>.

- Khakh, BS, XR Bao, C Labarca, and HA Lester. 1999. "Neuronal P2X Transmitter-Gated Cation Channels Change Their Ion Selectivity in Seconds." *Nature Neuroscience* 2 (4): 322–30. <https://doi.org/10.1038/7233>.
- Kido, Yuuka, Chiyo Kawahara, Yasuko Terai, Akihiro Ohishi, Satoshi Kobayashi, Miki Hayakawa, Yosuke Kamatsuka, Kentaro Nishida, and Kazuki Nagasawa. 2014. "Regulation of Activity of P2X7 Receptor by Its Splice Variants in Cultured Mouse Astrocytes." *Glia* 62 (3): 440–51. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22615>.
- Killeen, Meaghan E., Laura Ferris, Erine A. Kupetsky, Louis Falo, and Alicia R. Mathers. 2013. "Signaling through Purinergic Receptors for ATP Induces Human Cutaneous Innate and Adaptive Th17 Responses: Implications in the Pathogenesis of Psoriasis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (8): 4324–36. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1202045>.
- Kim, M, LH Jiang, HL Wilson, RA North, and A Surprenant. 2001. "Proteomic and Functional Evidence for a P2X7 Receptor Signalling Complex." *The EMBO Journal* 20 (22): 6347–58. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.22.6347>.
- Koch-Nolte, Friedrich, Anna Eichhoff, Carolina Pinto-Espinoza, Nicole Schwarz, Tobias Schäfer, Stephan Menzel, Friedrich Haag, Mélanie Demeules, Henri Gondé, and Sahil Adriouch. 2019. *Novel Biologics Targeting the P2X7 Ion Channel. Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.001>.
- Koch-Nolte, Friedrich, and Mathias Ziegler. 2013. "Physiology of ADP-Ribosylation." *The FEBS Journal* 280 (15): 3483. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12389>.
- Krebs, Christian, Sahil Adriouch, Fenja Braasch, Wolfgang Koestner, Edward H. Leiter, Michel Seman, Frances E. Lund, Norman Oppenheimer, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2005. "CD38 Controls ADP-Ribosyltransferase-2-Catalyzed ADP-Ribosylation of T Cell Surface Proteins." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (6): 3298–3305. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.6.3298>.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, and Laurence Zitvogel. 2013. "Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy." *Annual Review of Immunology* 31 (March): 51–72. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032712-100008>.
- Krummey, Scott M., Anna B. Morris, Jesica R. Jacobs, Donald J. McGuire, Satomi Ando, Katherine P. Tong, Weiwen Zhang, et al. 2020. "CD45RB Status of CD8+ T Cell Memory Defines T Cell Receptor Affinity and Persistence." *Cell Reports* 30 (5): 1282-1291.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.01.016>.

- Kubick, Christoph, Günther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2011. "The Effect of Anions on the Human P2X7 Receptor." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (12): 2913–22. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2011.08.017>.
- Kügelgen, Ivar Von, and Kristina Hoffmann. 2016. "Pharmacology and Structure of P2Y Receptors." *Neuropharmacology* 104 (May): 50–61. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.10.030>.
- Künzli, Beat M., Pascal O. Berberat, Thomas Giese, Eva Csizmadia, Elzbieta Kaczmarek, Colin Baker, Irfan Halaceli, Markus W. Büchler, Helmut Friess, and Simon C. Robson. 2007. "Upregulation of CD39/NTPDases and P2 Receptors in Human Pancreatic Disease." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00259.2006>.
- Künzli, Beat M., Maria Isabell Bernlochner, Stephan Rath, Samuel Käser, Eva Csizmadia, Keiichi Enjyoji, Peter Cowan, et al. 2011. "Impact of CD39 and Purinergic Signalling on the Growth and Metastasis of Colorectal Cancer." *Purinergic Signalling* 7 (2): 231–41. <https://doi.org/10.1007/S11302-011-9228-9>.
- Kurashima, Yosuke, Takeaki Amiya, Tomonori Nochi, Kumiko Fujisawa, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hiroko Tsutsui, et al. 2012. "Extracellular ATP Mediates Mast Cell-Dependent Intestinal Inflammation through P2X7 Purinoceptors." *Nature Communications* 2012 3:1 3 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS2023>.
- Kusner, DJ, and JA Barton. 2001. "ATP Stimulates Human Macrophages to Kill Intracellular Virulent Mycobacterium Tuberculosis via Calcium-Dependent Phagosome-Lysosome Fusion." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (6): 3308–15. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.6.3308>.
- Lambrecht, Bart N., Matthias Vanderkerken, and Hamida Hammad. 2018. "The Emerging Role of ADAM Metalloproteinases in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 2018 18:12 18 (12): 745–58. <https://doi.org/10.1038/S41577-018-0068-5>.
- Lammas, D. A., C. Stober, C. J. Harvey, N. Kendrick, S. Panchalingam, and D. S. Kumararatne. 1997a. "ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors." *Immunity* 7 (3): 433–44. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80364-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80364-7).
- . 1997b. "ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors." *Immunity* 7 (3): 433–44. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80364-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80364-7).
- Lara, Romain, Elena Adinolfi, Catherine A. Harwood, Mike Philpott, Julian A. Barden, Francesco Di

- Virgilio, and Shaun McNulty. 2020a. "P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics." *Frontiers in Pharmacology* 11 (June): 793. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00793/BIBTEX>.
- . 2020b. "P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics." *Frontiers in Pharmacology* 11 (June). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00793>.
- . 2020c. *P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics*. *Frontiers in Pharmacology*. Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00793>.
- Latchman, Yvette, Clive R. Wood, Tatyana Chernova, Divya Chaudhary, Madhuri Borde, Irene Chernova, Yoshiko Iwai, et al. 2001. "PD-L2 Is a Second Ligand for PD-1 and Inhibits T Cell Activation." *Nature Immunology* 2 (3): 261–68. <https://doi.org/10.1038/85330>.
- Lazarowski, Eduardo R. 2012. "Vesicular and Conductive Mechanisms of Nucleotide Release." *Purinergic Signalling* 8 (3): 359–73. <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9304-9>.
- Leach, Dana R., Matthew F. Krummel, and James P. Allison. 1996. "Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5256): 1734–36. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.271.5256.1734>.
- Lecciso, Mariangela, Darina Ocadlikova, Sabina Sangaletti, Sara Trabanelli, Elena De Marchi, Elisa Orioli, Anna Pegoraro, et al. 2017. "ATP Release from Chemotherapy-Treated Dying Leukemia Cells Elicits an Immune Suppressive Effect by Increasing Regulatory T Cells and Tolerogenic Dendritic Cells." *Frontiers in Immunology* 8 (DEC). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01918>.
- Ledent, C, JM Vaugeois, SN Schiffmann, T Pedrazzini, M El Yacoubi, JJ Vanderhaeghen, J Costentin, JK Heath, G Vassart, and Marc Parmentier. 1997. "Aggressiveness, Hypoalgesia and High Blood Pressure in Mice Lacking the Adenosine A2a Receptor." *Nature* 388 (6643): 674–78. <https://doi.org/10.1038/41771>.
- Lemaire, Irma, Simonetta Falzoni, Natacha Leduc, Bin Zhang, Patrizia Pellegatti, Elena Adinolfi, Paola Chiozzi, and Francesco Di Virgilio. 2006. "Involvement of the Purinergic P2X7 Receptor in the Formation of Multinucleated Giant Cells." *The Journal of Immunology* 177 (10): 7257–65. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.10.7257>.
- Lenertz, Lisa Y., Monica L. Gavala, Lindsay M. Hill, and Paul J. Bertics. 2009. "Cell Signaling via the P2X7 Nucleotide Receptor: Linkage to ROS Production, Gene Transcription, and Receptor Trafficking." *Purinergic Signalling* 5 (2): 175–87. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9133-7/FIGURES/8>.
- Lenschow, Deborah J., Yijun Zeng, J. Richard Thistlethwaite, Anthony Montag, William Brady,

- Marylou G. Gibson, Peter S. Linsley, and Jeffrey A. Bluestone. 1992. "Long-Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by CTLA4lg." *Science (New York, N.Y.)* 257 (5071): 789–92. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1323143>.
- Leone, Robert D., and Jonathan D. Powell. 2020. "Metabolism of Immune Cells in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 20:9 20 (9): 516–31. <https://doi.org/10.1038/S41568-020-0273-Y>.
- Li, Jieyao, Liping Wang, Xinfeng Chen, Lifeng Li, Yu Li, Yu Ping, Lan Huang, et al. 2017. "CD39/CD73 Upregulation on Myeloid-Derived Suppressor Cells via TGF- β -MTOR-HIF-1 Signaling in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncoimmunology* 6 (6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1320011>.
- Li, Ruiting Ruifang, Jing Wang, Ruiting Ruifang Li, Fangfang Zhu, Wenjuan Xu, Gan Zha, Guangzhen He, Huan Cao, Yimin Wang, and Jiong Yang. 2018. "ATP/P2X7-NLRP3 Axis of Dendritic Cells Participates in the Regulation of Airway Inflammation and Hyper-Responsiveness in Asthma by Mediating HMGB1 Expression and Secretion" 366 (1): 1–15. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/29545090/>.
- Li, Xian-Yang, Achim K. Moesta, Christos Xiao, Kyohei Nakamura, Mika Casey, Haiyan Zhang, Jason Madore, et al. 2019. "Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity." *Cancer Discovery*, November. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0541>.
- Li, Zhe, Ben Fillippo Krippendorff, Sharad Sharma, Antje C. Walz, Thierry Lavé, and Dhaval K. Shah. 2016. "Influence of Molecular Size on Tissue Distribution of Antibody Fragments." *MAbs* 8 (1): 113–19. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1111497>.
- Liang, Xin, Damien S. K. Samways, Kyle Wolf, Elizabeth A. Bowles, Jennifer P. Richards, Jonathan Bruno, Sébastien Dutertre, Richard J. DiPaolo, and Terrance M. Egan. 2015. "Quantifying Ca²⁺ Current and Permeability in ATP-Gated P2X7 Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (12): 7930. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.627810>.
- Linden, Joel, Friedrich Koch-Nolte, and Gerhard Dahl. 2019. "Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response." *Annual Review of Immunology* 37 (April): 325–47. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-051116-052406>.
- Linden, R. H.J. Van Der, L. G.J. Frenken, B. De Geus, M. M. Harmsen, R. C. Ruuls, W. Stok, L. De Ron, S. Wilson, P. Davis, and C. T. Verrips. 1999. "Comparison of Physical Chemical Properties of Llama VHH Antibody Fragments and Mouse Monoclonal Antibodies." *Biochimica et Biophysica Acta* 1431 (1): 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00030-8).
- Ling, Chen, Li Zhong, and Arun Srivastava. 2018. "Adeno-Associated Viral Vectors in Gene

- Therapy.” *ELS*, May, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0005738.PUB3>.
- Linsley, Peter S., Philip M. Wallace, Jennifer Johnson, Marylou G. Gibson, Jo Anne L. Greene, Jeffrey A. Ledbetter, Cherry Singh, and Mark A. Tepper. 1992. “Immunosuppression in Vivo by a Soluble Form of the CTLA-4 T Cell Activation Molecule.” *Science (New York, N.Y.)* 257 (5071): 792–95. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1496399>.
- Liu, Hong, Yujin Zhang, Hongyu Wu, Angelo D’Alessandro, Gennady G. Yegutkin, Anren Song, Kaiqi Sun, et al. 2016. “Beneficial Role of Erythrocyte Adenosine A2B Receptor-Mediated AMP-Activated Protein Kinase Activation in High-Altitude Hypoxia.” *Circulation* 134 (5): 405–21. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021311>.
- Liu, Xing, Zhibin Zhang, Jianbin Ruan, Youdong Pan, Venkat Giri Magupalli, Hao Wu, and Judy Lieberman. 2016. “Inflammasome-Activated Gasdermin D Causes Pyroptosis by Forming Membrane Pores.” *Nature* 2016 535:7610 535 (7610): 153–58. <https://doi.org/10.1038/NATURE18629>.
- Liu, Yanhui, Yajuan Xiao, and Zhiyuan Li. 2011. “P2X7 Receptor Positively Regulates MyD88-Dependent NF-KB Activation.” *Cytokine* 55 (2): 229–36. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2011.05.003>.
- Locovei, Silviu, Junjie Wang, and Gerhard Dahl. 2006. “Activation of Pannexin 1 Channels by ATP through P2Y Receptors and by Cytoplasmic Calcium.” *FEBS Letters* 580 (1): 239–44. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.12.004>.
- Loertscher, Rolf, and Paula Lavery. 2002. “The Role of Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI)-Anchored Cell Surface Proteins in T-Cell Activation.” *Transplant Immunology* 9 (2–4): 93–96. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(02)00013-8).
- Ma, Yuting, Laetitia Aymeric, Clara Locher, Stephen R. Mattarollo, Nicolas F. Delahaye, Pablo Pereira, Laurent Boucontet, et al. 2011. “Contribution of IL-17-Producing Gamma Delta T Cells to the Efficacy of Anticancer Chemotherapy.” *The Journal of Experimental Medicine* 208 (3): 491–503. <https://doi.org/10.1084/JEM.20100269>.
- Mackenzie, Amanda B., S. Wilson, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A, Amanda MacKenzie, et al. 2001. “Rapid Secretion of Interleukin-1beta by Microvesicle Shedding.” *Immunity* 15 (5): 825–35. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00229-1).
- Mackenzie, Amanda B., Mark T. Young, Elena Adinolfi, and Annmarie Surprenant. 2005. “Pseudoapoptosis Induced by Brief Activation of ATP-Gated P2X7 Receptors.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 33968–76. <https://doi.org/10.1074/JBC.M502705200>.
- Mak, W, Manfred Kopf, Martin F Bachmann, Gabriele Köhler, and Barbara Ecabert. 1999.

- “Autonomous in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease.” *J Immunol References* 163: 1128–31.
<http://www.jimmunol.org/content/163/3/http://www.jimmunol.org/content/163/3/1128.full#ref-list-1>.
- Maksimow, Mikael, Lea Kyhälä, Anne Nieminen, Leena Kylänpää, Kristiina Aalto, Kati Elima, Panu Mentula, et al. 2014. “Early Prediction of Persistent Organ Failure by Soluble CD73 in Patients with Acute Pancreatitis*.” *Critical Care Medicine* 42 (12): 2556–64.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000550>.
- Mansoor, Steven E., Wei Lü, Wout Oosterheert, Mrinal Shekhar, Emad Tajkhorshid, and Eric Gouaux. 2016. “X-Ray Structures Define Human P2X3 Receptor Gating Cycle and Antagonist Action.” *Nature* 538 (7623): 66. <https://doi.org/10.1038/NATURE19367>.
- Marchi, Elena De, Elisa Orioli, Diego Dal Ben, and Elena Adinolfi. 2016. “P2X7 Receptor as a Therapeutic Target.” *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 104: 39–79.
<https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2015.11.004>.
- Marchi, Elena De, Elisa Orioli, Anna Pegoraro, Sabina Sangaletti, Paola Portararo, Antonio Curti, Mario Paolo Colombo, Francesco Di Virgilio, and Elena Adinolfi. 2019. “The P2X7 Receptor Modulates Immune Cells Infiltration, Ectonucleotidases Expression and Extracellular ATP Levels in the Tumor Microenvironment.” *Oncogene* 38 (19): 3636–50.
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-0684-y>.
- Mariathasan, S, K Newton, DM Monack, D Vucic, DM French, WP Lee, M Roose-Girma, S Erickson, and VM Dixit. 2004. “Differential Activation of the Inflammasome by Caspase-1 Adaptors ASC and Ipaf.” *Nature* 430 (6996): 213–18. <https://doi.org/10.1038/NATURE02664>.
- Markwardt, Fritz, Matthias Löhn, Thomas Böhm, and Manuela Klapperstück. 1997. “Purinoreceptor-Operated Cationic Channels in Human B Lymphocytes.” *The Journal of Physiology* 498 (1): 143–51. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1997.SP021847>.
- Martel-Gallegos, G, G Casas-Pruneda, F Ortega-Ortega, S Sánchez-Armass, JA Olivares-Reyes, B Diebold, P Pérez-Cornejo, and J Arreola. 2013. “Oxidative Stress Induced by P2X7 Receptor Stimulation in Murine Macrophages Is Mediated by C-Src/Pyk2 and ERK1/2.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (10): 4650–59. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.05.023>.
- Martin, Elodie, Majid Amar, Carine Dalle, Ihsen Youssef, Céline Boucher, Caroline Le Duigou, Matthias Brückner, et al. 2018. “New Role of P2X7 Receptor in an Alzheimer’s Disease Mouse Model.” *Molecular Psychiatry* 24:1 24 (1): 108–25. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0108-3>.

- Martino, Ashley T., Masataka Suzuki, David M. Markusic, Irene Zolotukhin, Renee C. Ryals, Babak Moghimi, Hildegund C.J. Ertl, Daniel A. Muruve, Brendan Lee, and Roland W. Herzog. 2011. “The Genome of Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vectors Increases Toll-like Receptor 9–Dependent Innate Immune Responses in the Liver.” *Blood* 117 (24): 6459–68. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-10-314518>.
- Martins, Isabelle, Antoine Tesniere, Oliver Kepp, Mickael Michaud, Frederic Schlemmer, Laura Senovilla, Claire S  r  r, et al. 2009. “Chemotherapy Induces ATP Release from Tumor Cells.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (22): 3723–28. <https://doi.org/10.4161/CC.8.22.10026>.
- Mascanfroni, Ivan D., Maisa C. Takenaka, Ada Yeste, Bonny Patel, Yan Wu, Jessica E. Kenison, Shafiuddin Siddiqui, et al. 2015. “Metabolic Control of Type 1 Regulatory T Cell Differentiation by AHR and HIF1-  .” *Nature Medicine* 21 (6): 638–46. <https://doi.org/10.1038/NM.3868>.
- Masin, Marianela, Christopher Young, Koini Lim, Sara J. Barnes, Xing Jian Xu, Viola Marschall, Wojciech Bratkowski, et al. 2012. “Expression, Assembly and Function of Novel C-Terminal Truncated Variants of the Mouse P2X7 Receptor: Re-Evaluation of P2X7 Knockouts.” *British Journal of Pharmacology* 165 (4): 978–93. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01624.x>.
- Matty, Molly A., Daphne R. Knudsen, Eric M. Walton, Rebecca W. Beerman, Mark R. Cronan, Charlie J. Pyle, Rafael E. Hernandez, and David M. Tobin. 2019. “Potentiation of P2RX7 as a Host-Directed Strategy for Control of Mycobacterial Infection.” *ELife* 8 (January). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.39123>.
- Matute, Carlos, Iratxe Torre, Fernando Pérez-Cerdá, Alberto Pérez-Samartín, Elena Alberdi, Estibaliz Etxebarria, Amaia M. Arranz, et al. 2007. “P2X7 Receptor Blockade Prevents ATP Excitotoxicity in Oligodendrocytes and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Journal of Neuroscience* 27 (35): 9525–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0579-07.2007>.
- McCarthy, Alanna E., Craig Yoshioka, and Steven E. Mansoor. 2019. “Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Channel Desensitization.” *Cell* 179 (3): 659. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.09.017>.
- McCarty, D. M., H. Fu, P. E. Monahan, C. E. Toulson, P. Naik, and R. J. Samulski. 2003. “Adeno-Associated Virus Terminal Repeat (TR) Mutant Generates Self-Complementary Vectors to Overcome the Rate-Limiting Step to Transduction in Vivo.” *Gene Therapy* 2003 10:26 10 (26): 2112–18. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302134>.
- McCarty, D. M., P. E. Monahan, and R. J. Samulski. 2001. “Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus (ScAAV) Vectors Promote Efficient Transduction Independently of

- DNA Synthesis.” *Gene Therapy* 8 (16): 1248–54. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301514>.
- McLarnon, James G. 2017. “Roles of Purinergic P2X 7 Receptor in Glioma and Microglia in Brain Tumors.” *Cancer Letters* 402 (August): 93–99. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.05.004>.
- McNamara, N, A Khong, D McKemy, M Caterina, J Boyer, D Julius, and C Basbaum. 2001. “ATP Transduces Signals from ASGM1, a Glycolipid That Functions as a Bacterial Receptor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (16): 9086–91. <https://doi.org/10.1073/PNAS.161290898>.
- Mehta, Nisha, Maninder Kaur, Manjinder Singh, Sukhvair Chand, Bhawna Vyas, Pragati Silakari, Malkeet Singh Bahia, and Om Silakari. 2014. “Purinergic Receptor P2X7: A Novel Target for Anti-Inflammatory Therapy.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (1): 54–88. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2013.10.054>.
- Mello, Paola de Andrade, Robson Coutinho-Silva, and Luiz Eduardo Baggio Savio. 2017. “Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives.” *Frontiers in Immunology* 8 (NOV). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01526>.
- Metzger, MW, SM Walser, F Aprile-Garcia, N Dedic, A Chen, F Holsboer, E Arzt, W Wurst, and JM Deussing. 2017. “Genetically Dissecting P2rx7 Expression within the Central Nervous System Using Conditional Humanized Mice.” *Purinergic Signalling* 13 (2): 153–70. <https://doi.org/10.1007/S11302-016-9546-Z>.
- Michaud, Mickaël, Isabelle Martins, Abdul Qader Sukkurwala, Sandy Adjemian, Yuting Ma, Patrizia Pellegatti, Si Shen, et al. 2011. “Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice.” *Science (New York, N.Y.)* 334 (6062): 1573–77. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1208347>.
- Mishra, A, Y Guo, L Zhang, S More, T Weng, NR Chintagari, C Huang, et al. 2016. “A Critical Role for P2X7 Receptor-Induced VCAM-1 Shedding and Neutrophil Infiltration during Acute Lung Injury.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197 (7): 2828–37. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1501041>.
- Mittal, Deepak, Matthew M. Gubin, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2014. “New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases--Elimination, Equilibrium and Escape.” *Current Opinion in Immunology* 27 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2014.01.004>.
- Molinier-Frenkel, Valérie, and Flavia Castellano. 2017. “Immunosuppressive Enzymes in the Tumor Microenvironment.” *FEBS Letters* 591 (19): 3135–57. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12784>.

- Möller, Sina, Caroline Jung, Sahil Adriouch, Gudrun Dubberke, Fabienne Seyfried, Michel Seman, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2007. "Monitoring the Expression of Purinoceptors and Nucleotide-Metabolizing Ecto-Enzymes with Antibodies Directed against Proteins in Native Conformation." *Purinergic Signalling* 3 (4): 359–66. <https://doi.org/10.1007/S11302-007-9084-9/FIGURES/5>.
- Monif, M, CA Reid, KL Powell, ML Smart, and DA Williams. 2009. "The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (12): 3781–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5512-08.2009>.
- Montalbán del Barrio, Itsaso, Cornelia Penski, Laura Schlahsa, Roland G. Stein, Joachim Diessner, Achim Wöckel, Johannes Dietl, et al. 2016. "Adenosine-Generating Ovarian Cancer Cells Attract Myeloid Cells Which Differentiate into Adenosine-Generating Tumor Associated Macrophages - a Self-Amplifying, CD39- and CD73-Dependent Mechanism for Tumor Immune Escape." *Journal for Immunotherapy of Cancer* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/S40425-016-0154-9>.
- Moon, Hana, Hye Young Na, Kyung Hee Chong, and Tae Jin Kim. 2006. "P2X7 Receptor-Dependent ATP-Induced Shedding of CD27 in Mouse Lymphocytes." *Immunology Letters* 102 (1): 98–105. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2005.08.004>.
- Moore, Samantha F., and Amanda B. MacKenzie. 2009. "NADPH Oxidase NOX2 Mediates Rapid Cellular Oxidation Following ATP Stimulation of Endotoxin-Primed Macrophages." *The Journal of Immunology* 183 (5): 3302–8. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900394>.
- Mowers, Erin E., Marina N. Sharifi, and Kay F. Macleod. 2018. "Functions of Autophagy in the Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis." *The FEBS Journal* 285 (10): 1751–66. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14388>.
- Muller, Christa. 2015. "Medicinal Chemistry of P2X Receptors: Allosteric Modulators." *Current Medicinal Chemistry* 22 (7): 929–41. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141210155610>.
- Munn, David H., and Vincenzo Bronte. 2016. "Immune Suppressive Mechanisms in the Tumor Microenvironment." *Current Opinion in Immunology* 39 (April): 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2015.10.009>.
- Murrell-Lagnado, RD. 2017. "Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol." *Current Topics in Membranes* 80: 211–32. <https://doi.org/10.1016/BS.CTM.2017.05.004>.
- Mutini, C, S Falzoni, D Ferrari, P Chiozzi, A Morelli, O R Baricordi, G Collo, P Ricciardi-Castagnoli, and F Di Virgilio. 1999. "Mouse Dendritic Cells Express the P2X7 Purinergic Receptor:

- Characterization and Possible Participation in Antigen Presentation.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 163 (4): 1958–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438932>.
- Muyldermans, Serge. 2013. “Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies.” *Annual Review of Biochemistry* 82 (1): 775–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- Naito, Yoshitsugu, and John M. Lowenstein. 2002. “5’-Nucleotidase from Rat Heart.” *Biochemistry* 20 (18): 5188–94. <https://doi.org/10.1021/BI00521A014>.
- Nelson, Derek W., Robert J. Gregg, Michael E. Kort, Arturo Perez-Medrano, Eric A. Voight, Ying Wang, George Grayson, et al. 2006. “Structure-Activity Relationship Studies on a Series of Novel, Substituted 1-Benzyl-5-Phenyltetrazole P2X7 Antagonists.” *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (12): 3659–66. https://doi.org/10.1021/JM051202E/SUPPL_FILE/JM051202ESI20060403_114853.PDF.
- Neo, Shi Yong, Ying Yang, Record Julien, Ran Ma, Xinsong Chen, Ziqing Chen, Nicholas P. Tobin, et al. 2019. “CD73 Immune Checkpoint Defines Regulatory NK-Cells within the Tumor Microenvironment.” *Journal of Clinical Investigation*, November. <https://doi.org/10.1172/JCI128895>.
- Neves, Adriane R., Morgana T.L. Castelo-Branco, Vanessa R. Figliuolo, Claudio Bernardazzi, Fernanda Buongusto, Agnes Yoshimoto, Hayandra F. Nanini, et al. 2014. “Overexpression of ATP-Activated P2X7 Receptors in the Intestinal Mucosa Is Implicated in the Pathogenesis of Crohn’s Disease.” *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (3): 444–57. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441201.10454.06>.
- Nicke, Annette. 2008. “Homotrimeric Complexes Are the Dominant Assembly State of Native P2X7 Subunits.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377 (3): 803–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.042>.
- Nicke, Annette, Yung-Hui Hui Kuan, Marianela Masin, Jürgen Rettinger, Benjamin Marquez-Klaka, Olaf Bender, Dariusz C. Górecki, Ruth D. Murrell-Lagnado, and Florentina Soto. 2009. “A Functional P2X7 Splice Variant with an Alternative Transmembrane Domain 1 Escapes Gene Inactivation in P2X7 Knock-out Mice.” *Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 25813–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.033134>.
- Nishimura, Hiroyuki, Masato Nose, Hiroshi Hiai, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo. 1999. “Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor.” *Immunity* 11 (2): 141–51. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8).
- Noguchi, Takuya, Ken Ishii, Hisashi Fukutomi, Isao Naguro, Atsushi Matsuzawa, Kohsuke Takeda,

- and Hidenori Ichijo. 2008. "Requirement of Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of ASK1-P38 MAPK Pathway for Extracellular ATP-Induced Apoptosis in Macrophage." *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7657–65. <https://doi.org/10.1074/JBC.M708402200>.
- Nörenberg, W., H. Sobottka, C. Hempel, T. Plötz, W. Fischer, G. Schmalzing, and M. Schaefer. 2012. "Positive Allosteric Modulation by Ivermectin of Human but Not Murine P2X7 Receptors." *British Journal of Pharmacology* 167 (1): 48–66. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.01987.X>.
- Nörenberg, Wolfgang, Christoph Hempel, Nicole Urban, Helga Sobottka, Peter Illes, and Michael Schaefer. 2011. "Clemastine Potentiates the Human P2X7 Receptor by Sensitizing It to Lower ATP Concentrations." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (13): 11067–81. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.198879>.
- North, R. Alan. 2002. "Molecular Physiology of P2X Receptors." <https://doi.org/10.1152/Physrev.00015.2002> 82 (4): 1013–67. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2002>.
- North, R. Alan, and Michael F. Jarvis. 2013. "P2X Receptors as Drug Targets." *Molecular Pharmacology* 83 (4): 759–69. <https://doi.org/10.1124/MOL.112.083758>.
- North, R. Alan, and Annmarie Surprenant. 2003. "Pharmacology of Cloned P2X Receptors." <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.563> 40 (November): 563–80. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.40.1.563>.
- North, R. A. 2002. "Molecular Physiology of P2X Receptors." *Physiological Reviews* 82 (4): 1013–67. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2002>.
- Nunes-Xavier, Caroline E., Javier C. Angulo, Rafael Pulido, and José I. López. 2019. "A Critical Insight into the Clinical Translation of PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *Current Urology Reports* 20 (1). <https://doi.org/10.1007/S11934-019-0866-8>.
- Ohaegbulam, Kim C., Amer Assal, Eszter Lazar-Molnar, Yu Yao, and Xingxing Zang. 2015. "Human Cancer Immunotherapy with Antibodies to the PD-1 and PD-L1 Pathway." *Trends in Molecular Medicine* 21 (1): 24. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2014.10.009>.
- Ohshima, Yasuhiro, Mitsutoshi Tsukimoto, Takato Takenouchi, Hitoshi Harada, Akina Suzuki, Mitsuru Sato, Hiroshi Kitani, and Shuji Kojima. 2010. "Gamma-Irradiation Induces P2X(7) Receptor-Dependent ATP Release from B16 Melanoma Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1800 (1): 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2009.10.008>.
- Ohta, A., and M. Sitkovsky. 2001. "Role of G-Protein-Coupled Adenosine Receptors in Downregulation of Inflammation and Protection from Tissue Damage." *Nature* 414 (6866): 916–

20. <https://doi.org/10.1038/414916A>.
- Ohta, Akio, Elieser Gorelik, Simon J. Prasad, Franca Ronchese, Dmitriy Lukashev, Michael K.K. Wong, Xiaojun Huang, et al. 2006. "A2A Adenosine Receptor Protects Tumors from Antitumor T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 13132–37. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605251103>.
- Orioli, Elisa, Elena De Marchi, Anna Lisa Giuliani, and Elena Adinolfi. 2017. "P2X7 Receptor Orchestrates Multiple Signalling Pathways Triggering Inflammation, Autophagy and Metabolic/Trophic Responses." *Current Medicinal Chemistry* 24 (21). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170303161659>.
- Ousingsawat, J, P Wanitchakool, A Kmit, AM Romao, W Jantarajit, R Schreiber, and K Kunzelmann. 2015. "Anoctamin 6 Mediates Effects Essential for Innate Immunity Downstream of P2X7 Receptors in Macrophages." *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS7245>.
- Oviedo-Orta, Ernesto, and W. Howard Evans. 2004. "Gap Junctions and Connexin-Mediated Communication in the Immune System." *Biochimica et Biophysica Acta* 1662 (1–2): 102–12. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2003.10.021>.
- Pagès, Franck, Anne Berger, Matthieu Camus, Fatima Sanchez-Cabo, Anne Costes, Robert Molitor, Bernhard Mlecnik, et al. 2005. "Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 353 (25): 2654–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA051424>.
- Paluch, Ewa K., and Erez Raz. 2013. "The Role and Regulation of Blebs in Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 582–90. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2013.05.005>.
- Pardoll, Drew M. 2012. "The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Cancer* 2012 12:4 12 (4): 252–64. <https://doi.org/10.1038/NRC3239>.
- Parsa, Andrew T., James S. Waldron, Amith Panner, Courtney A. Crane, Ian F. Parney, Jeffrey J. Barry, Kristine E. Cachola, et al. 2007. "Loss of Tumor Suppressor PTEN Function Increases B7-H1 Expression and Immuno-resistance in Glioma." *Nature Medicine* 13 (1): 84–88. <https://doi.org/10.1038/NM1517>.
- Pegoraro, Anna, Elena De Marchi, Manuela Ferracin, Elisa Orioli, Michele Zanoni, Cristian Bassi, Anna Tesei, et al. 2021. "P2X7 Promotes Metastatic Spreading and Triggers Release of MiRNA-Containing Exosomes and Microvesicles from Melanoma Cells." *Cell Death & Disease* 12 (12). <https://doi.org/10.1038/S41419-021-04378-0>.
- Pelegrin, Pablo, and A. Surprenant. 2006. "Pannexin-1 Mediates Large Pore Formation and Interleukin-1 β Release by the ATP-Gated P2X7 Receptor." *The EMBO Journal* 25 (21):

- 5071–82. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601378>.
- Pellegatti, Patrizia, Lizzia Raffaghello, Giovanna Bianchi, Federica Piccardi, Vito Pistoia, Francesco Di Virgilio, and Francesco Di Virgilio. 2008. “Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase.” *PLoS ONE* 3 (7): 3856–64. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>.
- Pérez-Flores, Gabriela, Sébastien A. Lévesque, Jonathan Pacheco, Luis Vaca, Steve Lacroix, Patricia Pérez-Cornejo, and Jorge Arreola. 2015. “The P2X7/P2X4 Interaction Shapes the Purinergic Response in Murine Macrophages.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (3): 484–90. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.10.025>.
- Perregaux, David G., Pat McNiff, Ron Laliberte, Maryrose Conklyn, and Christopher A. Gabel. 2000. “ATP Acts as an Agonist to Promote Stimulus-Induced Secretion of IL-1 β and IL-18 in Human Blood.” *The Journal of Immunology* 165 (8): 4615–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4615>.
- Peverini, Laurie, Juline Beudez, Kate Dunning, Thierry Chataigneau, and Thomas Grutter. 2018. “New Insights Into Permeation of Large Cations Through ATP-Gated P2X Receptors.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 265. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00265>.
- Pfeiffer, Zachary A., Alma N. Guerra, Lindsay M. Hill, Monica L. Gavala, Usha Prabhu, Mini Aga, David J. Hall, and Paul J. Bertics. 2007. “Nucleotide Receptor Signaling in Murine Macrophages Is Linked to Reactive Oxygen Species Generation.” *Free Radical Biology & Medicine* 42 (10): 1506–16. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2007.02.010>.
- Piccini, A, S Carta, S Tassi, D Lasiglié, G Fossati, and A Rubartelli. 2008. “ATP Is Released by Monocytes Stimulated with Pathogen-Sensing Receptor Ligands and Induces IL-1 β and IL-18 Secretion in an Autocrine Way.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (23): 8067–72. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0709684105>.
- Pietrocola, Federico, José Manuel Bravo-San Pedro, Lorenzo Galluzzi, and Guido Kroemer. 2017. “Autophagy in Natural and Therapy-Driven Anticancer Immunosurveillance.” *Autophagy* 13 (12): 2163–70. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1310356>.
- Pippel, Anja, Michaela Stolz, Ronja Woltersdorf, Achim Kless, Gönther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2017. “Localization of the Gate and Selectivity Filter of the Full-Length P2X7 Receptor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (11): E2156–65. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1610414114>.
- Pizzirani, Cinzia, Davide Ferrari, Paola Chiozzi, Elena Adinolfi, Dorianna Sandonà, Erika Savaglio, Francesco Di Virgilio, et al. 2007. “Stimulation of P2 Receptors Causes Release of IL-1 β -

- Loaded Microvesicles from Human Dendritic Cells.” *Blood* 109 (9): 3856–64.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-06-031377>.
- Poulsen, Sally Ann, and Ronald J. Quinn. 1998. “Adenosine Receptors: New Opportunities for Future Drugs.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6 (6): 619–41. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00038-8).
- Proietti, M, V Cornacchione, T Rezzonico Jost, A Romagnani, CE Faliti, L Perruzza, R Rigoni, et al. 2014. “ATP-Gated Ionotropic P2X7 Receptor Controls Follicular T Helper Cell Numbers in Peyer’s Patches to Promote Host-Microbiota Mutualism.” *Immunity* 41 (5): 789–801.
<https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.10.010>.
- Proietti, Michele, Lisa Perruzza, Daniela Scribano, Giovanni Pellegrini, Rocco D’Antuono, Francesco Strati, Marco Raffaelli, et al. 2019. “ATP Released by Intestinal Bacteria Limits the Generation of Protective IgA against Enteropathogens.” *Nature Communications* 2019 10:1 10 (1): 1–11.
<https://doi.org/10.1038/S41467-018-08156-Z>.
- Pulte, Dianne, Richard R. Furman, M. Johan Broekman, Joan H.F. Drosopoulos, Harold S. Ballard, Kim E. Olson, Jorge R. Kizer, and Aaron J. Marcus. 2011. “CD39 Expression on T Lymphocytes Correlates With Severity of Disease in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia.” *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 11 (4): 367–72.
<https://doi.org/10.1016/J.CLML.2011.06.005>.
- Pupovac, A, CM Foster, and R. Sluyter. 2013. “Human P2X7 Receptor Activation Induces the Rapid Shedding of CXCL16.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432 (4): 626–31. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.01.134>.
- Pupovac, A, NJ Geraghty, D Watson, and R Sluyter. 2015. “Activation of the P2X7 Receptor Induces the Rapid Shedding of CD23 from Human and Murine B Cells.” *Immunology and Cell Biology* 93 (1): 77–85. <https://doi.org/10.1038/ICB.2014.69>.
- Qian, Yanrong, Xuan Wang, Yi Liu, Yunsheng Li, Robert A. Colvin, Lingying Tong, Shiyong Wu, and Xiaozhuo Chen. 2014. “Extracellular ATP Is Internalized by Macropinocytosis and Induces Intracellular ATP Increase and Drug Resistance in Cancer Cells.” *Cancer Letters* 351 (2): 242–51. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2014.06.008>.
- Qin, Juliang, Xiaoyu Zhang, Binghe Tan, Su Zhang, Chengcong Yin, Qi Xue, Zhen Zhang, et al. 2020. “Blocking P2X7-Mediated Macrophage Polarization Overcomes Treatment Resistance in Lung Cancer.” *Cancer Immunology Research* 6: canimm.0123.2020. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-20-0123>.
- Qiu, Feng, and Gerhard Dahl. 2009. “A Permeant Regulating Its Permeation Pore: Inhibition of

- Pannexin 1 Channels by ATP.” *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 296 (2).
<https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00433.2008>.
- Qiu, Ying, Wei Hua Li, Hong Quan Zhang, Yan Liu, Xin Xia Tian, and Wei Gang Fang. 2014. “P2X7 Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells.” *PLOS ONE* 9 (12): e114371.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114371>.
- Qu, Yan, and George R. Dubyak. 2009. “P2X7 Receptors Regulate Multiple Types of Membrane Trafficking Responses and Non-Classical Secretion Pathways.” *Purinergic Signalling* 2009 5:2 5 (2): 163–73. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9132-8>.
- Qureshi, Omar S., Yong Zheng, Kyoko Nakamura, Kesley Attridge, Claire Manzotti, Emily M. Schmidt, Jennifer Baker, et al. 2011. “Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell Extrinsic Function of CTLA-4.” *Science (New York, N.Y.)* 332 (6029): 600.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1202947>.
- Rabinowitz, Joseph E., Fabienne Rolling, Chengwen Li, Hervé Conrath, Weidong Xiao, Xiao Xiao, and R. Jude Samulski. 2002. “Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity.” *Journal of Virology* 76 (2): 791–801. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.791-801.2002>.
- Raffaghello, Lizzia, Paola Chiozzi, Simonetta Falzoni, Francesco Di Virgilio, and Vito Pistoia. 2006. “The P2X7 Receptor Sustains the Growth of Human Neuroblastoma Cells through a Substance P-Dependent Mechanism.” *Cancer Research* 66 (2): 907–14. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3185>.
- Ramos-Casals, Manuel, Julie R. Brahmer, Margaret K. Callahan, Alejandra Flores-Chávez, Niamh Keegan, Munther A. Khamashta, Olivier Lambotte, Xavier Mariette, Aleix Prat, and Maria E. Suárez-Almazor. 2020. “Immune-Related Adverse Events of Checkpoint Inhibitors.” *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1 6 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1038/S41572-020-0160-6>.
- Rashidian, Mohammad, Martin W. LaFleur, Vincent L. Verschoor, Anushka Dongre, Yun Zhang, Thao H. Nguyen, Stephen Kolifrath, et al. 2019. “Immuno-PET Identifies the Myeloid Compartment as a Key Contributor to the Outcome of the Antitumor Response under PD-1 Blockade.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (34): 16971–80. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1905005116>.
- Reichenbach, Nicole, Andrea Delekate, Björn Breithausen, Kevin Keppler, Stefanie Poll, Theresa Schulte, Jan Peter, et al. 2018. “P2Y1 Receptor Blockade Normalizes Network Dysfunction and Cognition in an Alzheimer’s Disease Model.” *Journal of Experimental Medicine* 215 (6): 1649–63. <https://doi.org/10.1084/JEM.20171487/VIDEO-1>.

- Riedel, T., G. Schmalzing, and F. Markwardt. 2007. "Influence of Extracellular Monovalent Cations on Pore and Gating Properties of P2X7 Receptor-Operated Single-Channel Currents." *Biophysical Journal* 93 (3): 846–58. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.103614>.
- Rissiek, Björn, Friedrich Haag, Olivier Boyer, Friedrich Koch-Nolte, and Sahil Adriouch. 2015. "P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00204>.
- Rissiek, Björn, Marco Lukowiak, Friederike Raczkowski, Tim Magnus, Hans Willi Mittrücker, and Friedrich Koch-Nolte. 2018. "In Vivo Blockade of Murine ARTC2.2 during Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells." *Frontiers in Immunology* 9 (JUL): 1580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01580>.
- Robles, René J., Samiran Mukherjee, Marta Vuerich, Anyan Xie, Rasika Harshe, Peter J. Cowan, Eva Csizmadia, et al. 2020. "Modulation of CD39 and Exogenous APT102 Correct Immune Dysfunction in Experimental Colitis and Crohn's Disease." *Journal of Crohn's & Colitis* 14 (6): 818–30. <https://doi.org/10.1093/ECCO-JCC/JJZ182>.
- Roger, S, ZZ Mei, JM Baldwin, L Dong, H Bradley, SA Baldwin, A Surprenant, and LH Jiang. 2010. "Single Nucleotide Polymorphisms That Were Identified in Affective Mood Disorders Affect ATP-Activated P2X7 Receptor Functions." *Journal of Psychiatric Research* 44 (6): 347–55. <https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHIRES.2009.10.005>.
- Roger, Sébastien, Pablo Pelegrin, and Annmarie Surprenant. 2008. "Facilitation of P2X7 Receptor Currents and Membrane Blebbing via Constitutive and Dynamic Calmodulin Binding." *Journal of Neuroscience* 28 (25): 6393–6401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0696-08.2008>.
- Romagnani, Andrea, Elsa Rottoli, Emilia Maria Cristina Mazza, Tanja Rezzonico-Jost, Benedetta De Ponte Conti, Michele Proietti, Michela Perotti, et al. 2020. "P2X7 Receptor Activity Limits Accumulation of T Cells within Tumors." *Cancer Research*, canres.3807.2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-19-3807>.
- Roo, Mathias De, Jean Luc Rodeau, and Rémy Schlichter. 2003. "Dehydroepiandrosterone Potentiates Native Ionotropic ATP Receptors Containing the P2X2 Subunit in Rat Sensory Neurones." *The Journal of Physiology* 552 (1): 59–71. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2003.046078>.
- Ruan, Zhi, Jean Christophe Delpech, Srinidhi Venkatesan Kalavai, Alicia A. Van Enoo, Jianqiao Hu, Seiko Ikezu, and Tsuneya Ikezu. 2020. "P2RX7 Inhibitor Suppresses Exosome Secretion and Disease Phenotype in P301S Tau Transgenic Mice." *Molecular Neurodegeneration* 15 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13024-020-00396-2/FIGURES/6>.
- Rudd, Christopher E. 2008. "The Reverse Stop-Signal Model for CTLA4 Function." *Nature Reviews*.

Immunology 8 (2): 153–60. <https://doi.org/10.1038/NRI2253>.

- Ryzhov, Sergey V., Michael W. Pickup, Anna Chytil, Agnieszka E. Gorska, Qinkun Zhang, Philip Owens, Igor Feoktistov, Harold L. Moses, and Sergey V. Novitskiy. 2014. “Role of TGF- β Signaling in Generation of CD39+CD73+ Myeloid Cells in Tumors.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193 (6): 3155–64. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400578>.
- Saber, Sameh, Mahmoud E. Youssef, Hossam Sharaf, Noha A. Amin, Ruwyda El-Shedody, Farah H. Aboutouk, Yumna Abd El-Galeel, et al. 2021. “BBG Enhances OLT1177-Induced NLRP3 Inflammasome Inactivation by Targeting P2X7R/NLRP3 and MyD88/NF-KB Signaling in DSS-Induced Colitis in Rats.” *Life Sciences* 270 (April). <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119123>.
- Sadej, Rafal, Kunihiro Inai, Zenon Rajfur, Anna Ostapkowicz, Jon Kohler, Andrzej C. Skladanowski, Beverly S. Mitchell, and Jozef Spychala. 2008. “Tenascin C Interacts with Ecto-5'-Nucleotidase (EN) and Regulates Adenosine Generation in Cancer Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (1): 35–40. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2007.11.001>.
- Saéz, Pablo J., Pablo Vargas, Kenji F. Shoji, Paloma A. Harcha, Ana Mariá Lennon-Duméni, and Juan C. Saéz. 2017. “ATP Promotes the Fast Migration of Dendritic Cells through the Activity of Pannexin 1 Channels and P2X7 Receptors.” *Science Signaling* 10 (506). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7107>.
- Sala, Andrea la, Davide Ferrari, Silvia Corinti, Andrea Cavani, Francesco Di Virgilio, and Giampiero Girolomoni. 2001. “Extracellular ATP Induces a Distorted Maturation of Dendritic Cells and Inhibits Their Capacity to Initiate Th1 Responses.” *The Journal of Immunology* 166 (3): 1611–17. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.3.1611>.
- Sala, Andrea La, Silvia Sebastiani, Davide Ferrari, Francesco Di Virgilio, Marco Idzko, Johannes Norgauer, and Giampiero Girolomoni. 2002. “Dendritic Cells Exposed to Extracellular Adenosine Triphosphate Acquire the Migratory Properties of Mature Cells and Show a Reduced Capacity to Attract Type 1 T Lymphocytes.” *Blood* 99 (5): 1715–22. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.5.1715>.
- Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein, and L. A. Hunter. 1991. “Targeted Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) into Human Chromosome 19.” *The EMBO Journal* 10 (12): 3941. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04964.x>.
- Sánchez-Nogueiro, J, P Marín-García, and MT Miras-Portugal. 2005. “Characterization of a Functional P2X(7)-like Receptor in Cerebellar Granule Neurons from P2X(7) Knockout Mice.” *FEBS Letters* 579 (17): 3783–88. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.05.073>.
- Sanz, Juana M., Paola Chiozzi, and Francesco Di Virgilio. 1998. “Tenidap Enhances P2Z/P2X7

- Receptor Signalling in Macrophages.” *European Journal of Pharmacology* 355 (2–3): 235–44.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00482-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00482-8).
- Sanz, and Di Virgilio. 2000. “Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 Beta Release from Microglial Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (9): 4893–98.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.9.4893>.
- Saunders, Kevin O., Lingshu Wang, M. Gordon Joyce, Zhi-Yong Yang, Alejandro B. Balazs, Cheng Cheng, Sung-Youl Ko, et al. 2015. “Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection.” *Journal of Virology* 89 (16): 8334–45.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00908-15>.
- Schenk, U, M Frascoli, M Proietti, R Geffers, E Traggiai, J Buer, C Ricordi, AM Westendorf, and F Grassi. 2011. “ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells through the Activation of Purinergic P2X Receptors.” *Science Signaling* 4 (162).
<https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2001270>.
- Schenk, Ursula, Astrid M. Westendorf, Enrico Radaelli, Anna Casati, Micol Ferro, Marta Fumagalli, Claudia Verderio, Jan Buer, Eugenio Scanziani, and Fabio Grassi. 2008. “Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released through Pannexin-1 Hemichannels.” *Science Signaling* 1 (39).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.1160583>.
- Scheuplein, Felix, Nicole Schwarz, Sahil Adriouch, Christian Krebs, Peter Bannas, Björn Rissiek, Michel Seman, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2009. “NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells.” *The Journal of Immunology* 182 (5): 2898–2908.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0801711>.
- Schmid, Severin, Markus Kübler, C. Korcan Ayata, Zsofia Lazar, Benedikt Haager, Madelon Hoßfeld, Anja Meyer, et al. 2015. “Altered Purinergic Signaling in the Tumor Associated Immunologic Microenvironment in Metastasized Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 90 (3): 516–21. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2015.10.005>.
- Schneider, Enja, Anne Rissiek, Riekje Winzer, Berta Puig, Björn Rissiek, Friedrich Haag, Hans-Willi Mittrücker, Tim Magnus, and Eva Tolosa. 2019. “Generation and Function of Non-Cell-Bound CD73 in Inflammation.” *Frontiers in Immunology* 10 (July): 1729.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01729>.
- Schnurr, Max, Tracey Toy, Amanda Shin, Moritz Wagner, Jonathan Cebon, and Eugene Maraskovsky. 2005. “Extracellular Nucleotide Signaling by P2 Receptors Inhibits IL-12 and

- Enhances IL-23 Expression in Human Dendritic Cells: A Novel Role for the CAMP Pathway.” *Blood* 105 (4): 1582–89. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-05-1718>.
- Schumacher, Dagmar, Boris Strilic, Kishor Kumar Sivaraj, Nina Wettschureck, and Stefan Offermanns. 2013. “Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor.” *Cancer Cell* 24 (1): 130–37. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.05.008>.
- Schwarz, Nicole, Laurent Drouot, Annette Nicke, Ralf Fliegert, Olivier Boyer, Andreas H. Guse, Friedrich Haag, Sahil Adriouch, and Friedrich Koch-Nolte. 2012. “Alternative Splicing of the N-Terminal Cytosolic and Transmembrane Domains of P2X7 Controls Gating of the Ion Channel by ADP-Ribosylation.” *PLOS ONE* 7 (7): e41269. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041269>.
- Schwarz, Nicole, Ralf Fliegert, Sahil Adriouch, Michel Seman, Andreas H. Guse, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2009. “Activation of the P2X7 Ion Channel by Soluble and Covalently Bound Ligands.” *Purinergic Signalling* 2009 5:2 5 (2): 139–49. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9135-5>.
- Seman, Michel, Sahil Adriouch, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2004. “Ecto-ADP-Ribosyltransferases (ARTs): Emerging Actors in Cell Communication and Signaling.” *Current Medicinal Chemistry* 11 (7): 857–72. <https://doi.org/10.2174/0929867043455611>.
- Seman, Michel, Sahil Adriouch, Felix Scheuplein, Christian Krebs, Dunja Freese, Gustavo Glowacki, Phillipe Deterre, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2003. “NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor.” *Immunity* 19 (4): 571–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00266-8).
- Sengstake, Sarah, Eva-Maria Boneberg, and Harald Illges. 2006. “CD21 and CD62L Shedding Are Both Inducible via P2X7Rs.” *International Immunology* 18 (7): 1171–78. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXL051>.
- Sharp, Anthony J., Paul E. Polak, Vittoria Simonini, Shao X. Lin, Jill C. Richardson, Ernesto R. Bongarzone, and Douglas L. Feinstein. 2008. “P2x7 Deficiency Suppresses Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Journal of Neuroinflammation* 5: 33. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-33>.
- Sharpe, Arlene H., E. John Wherry, Rafi Ahmed, and Gordon J. Freeman. 2007. “The Function of Programmed Cell Death 1 and Its Ligands in Regulating Autoimmunity and Infection.” *Nature Immunology* 8 (3): 239–45. <https://doi.org/10.1038/NI1443>.
- Shen, Li, Anette Sundstedt, Michael Ciesielski, Kiersten Marie Miles, Mona Celander, Remi

- Adelaiye, Ashley Orillion, et al. 2015. "Tasquinimod Modulates Suppressive Myeloid Cells and Enhances Cancer Immunotherapies in Murine Models." *Cancer Immunology Research* 3 (2): 136–48. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0036>.
- Shi, H, Y Wang, X Li, X Zhan, M Tang, M Fina, L Su, et al. 2016. "NLRP3 Activation and Mitosis Are Mutually Exclusive Events Coordinated by NEK7, a New Inflammasome Component." *Nature Immunology* 17 (3): 250–58. <https://doi.org/10.1038/NI.3333>.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang, Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang, and Feng Shao. 2015. "Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death." *Nature* 2015 526:7575 526 (7575): 660–65. <https://doi.org/10.1038/NATURE15514>.
- Sim, Joan A., Mark T. Young, Hye Youn Sung, R. Alan North, and Annmarie Surprenant. 2004. "Reanalysis of P2X7 Receptor Expression in Rodent Brain." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (28): 6307–14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-04.2004>.
- Sitkovsky, Michail V., Stephen Hatfield, Robert Abbott, Bryan Belikoff, Dmitriy Lukashev, and Akio Ohta. 2014. "Hostile, Hypoxia-A2-Adenosinergic Tumor Biology as the next Barrier to Overcome for Tumor Immunologists." *Cancer Immunology Research* 2 (7): 598–605. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0075>.
- Sluyter, Ronald. 2015. "P2X and P2Y Receptor Signaling in Red Blood Cells." *Frontiers in Molecular Biosciences* 2 (OCT). <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2015.00060>.
- Smart, Megan L., Ben Gu, Rekha G. Panchal, James Wiley, Brett Cromer, David A. Williams, and Steven Petrou. 2003. "P2X7 Receptor Cell Surface Expression and Cytolytic Pore Formation Are Regulated by a Distal C-Terminal Region." *Journal of Biological Chemistry* 278 (10). <https://doi.org/10.1074/jbc.M211094200>.
- Soares-Bezerra, Rômulo J., Rosa T. Pinho, Rodrigo Da C. Bisaggio, Thereza Christina Benévolo-De-Andrade, and Luiz A. Alves. 2015. "The Search for New Agonists to P2X7R for Clinical Use: Tuberculosis as a Possible Target." *Cellular Physiology and Biochemistry* 37 (2): 409–18. <https://doi.org/10.1159/000430364>.
- Solini, Anna, and Ivana Novak. 2019. "Role of the P2X7 Receptor in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes and Its Microvascular Complications." *Current Opinion in Pharmacology* 47 (August): 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2019.02.009>.
- Solini, Anna, Chiara Rossi, Eleonora Santini, Martina Giuntini, Francesco Raggi, Federico Parolini, Edoardo Biancalana, Eleonora Del Prete, Ubaldo Bonuccelli, and Roberto Ceravolo. 2021.

- “P2X7 Receptor/NLRP3 Inflammasome Complex and α -Synuclein in Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Prospective Study in Neo-Diagnosed, Treatment-Naïve Parkinson’s Disease.” *European Journal of Neurology* 28 (8): 2648–56. <https://doi.org/10.1111/ENE.14918>.
- Solle, Mike, Jeff Labasi, David G. Perregaux, Ethan Stam, Nina Petrushova, Beverly H. Koller, Richard J. Griffiths, and Christopher A. Gabel. 2001. “Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (1): 125–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>.
- Sommer, Anselm, Felix Kordowski, Joscha Büch, Thorsten Maretzky, Astrid Evers, Jrg Andrä, Stefan Düsterhöft, et al. 2016. “Phosphatidylserine Exposure Is Required for ADAM17 Sheddase Function.” *Nature Communications* 7 (May): 11523. <https://doi.org/10.1038/ncomms11523>.
- Soond, SM, B Everson, DW Riches, and G Murphy. 2005. “ERK-Mediated Phosphorylation of Thr735 in TNF α -Converting Enzyme and Its Potential Role in TACE Protein Trafficking.” *Journal of Cell Science* 118 (Pt 11): 2371–80. <https://doi.org/10.1242/JCS.02357>.
- Stagg, John, Paul A. Beavis, Upulie Divisekera, Mira C.P. Liu, Andreas Möller, Phillip K. Darcy, and Mark J. Smyth. 2012. “CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis.” *Cancer Research* 72 (9): 2190–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0420>.
- Stagg, John, Upulie Divisekera, Helene Duret, Tim Sparwasser, Michele W.L. Teng, Phillip K. Darcy, and Mark J. Smyth. 2011. “CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis.” *Cancer Research* 71 (8): 2892–2900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4246>.
- Stagg, John, Upulie Divisekera, Nicole McLaughlin, Janelle Sharkey, Sandra Pommey, Delphine Denoyer, Karen M. Dwyer, and Mark J. Smyth. 2010. “Anti-CD73 Antibody Therapy Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4): 1547–52. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0908801107>.
- Stark, Regina, Thomas H. Wesselink, Felix M. Behr, Natasja A.M. M. Kragten, Ramon Arens, Friedrich Koch-Nolte, Klaas P.J.M. van Gisbergen, René A.W. van Lier, Klaas P. J. M. van Gisbergen, and René A. W. van Lier. 2018. “TRM Maintenance Is Regulated by Tissue Damage via P2RX7.” *Science Immunology* 3 (30). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau1022>.
- Staron, Matthew M., Simon M. Gray, Heather D. Marshall, Ian A. Parish, Jonathan H. Chen, Curtis J. Perry, Guoliang Cui, Ming O. Li, and Susan M. Kaeck. 2014. “The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8⁺ T Cells during Chronic Infection.” *Immunity* 41 (5): 802. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.10.013>.

- Stock, Thomas C., Bradley J. Bloom, Nathan Wei, Saliha Ishaq, Won Park, Xin Wang, Pankaj Gupta, and Charles A. Mebus. 2012. "Efficacy and Safety of CE-224,535, an Antagonist of P2X7 Receptor, in Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis Inadequately Controlled by Methotrexate." *The Journal of Rheumatology* 39 (4): 720–27. <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.110874>.
- Stokes, Leanne, Stefan Bidula, Lučka Bibič, and Elizabeth Allum. 2020. "To Inhibit or Enhance? Is There a Benefit to Positive Allosteric Modulation of P2X Receptors?" *Frontiers in Pharmacology* 0 (May): 627. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00627>.
- Stokes, Leanne, Stephen J. Fuller, Ronald Sluyter, Kristen K. Skarratt, Ben J. Gu, and James S. Wiley. 2010. "Two Haplotypes of the P2X7 Receptor Containing the Ala-348 to Thr Polymorphism Exhibit a Gain-of-Function Effect and Enhanced Interleukin-1 β Secretion." *The FASEB Journal* 24 (8): 2916–27. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-150862>.
- Sun, Daqing, Linda C. Samuelson, Tianxin Yang, Yuning Huang, Alex Paliege, Thom Saunders, Josie Briggs, and Jurgen Schnermann. 2001. "Mediation of Tubuloglomerular Feedback by Adenosine: Evidence from Mice Lacking Adenosine 1 Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9983–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.171317998>.
- Sun, Xiaofeng, Yan Wu, Wenda Gao, Keiichi Enjyoji, Eva Csizmadia, Christa E. Müller, Takashi Murakami, and Simon C. Robson. 2010. "CD39/ENTPD1 Expression by CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells Promotes Hepatic Metastatic Tumor Growth in Mice." *Gastroenterology* 139 (3): 1030–40. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/20546740/>.
- Supernat, Anna, Aleksandra Markiewicz, Marzena Wełnicka-Jaśkiewicz, Barbara Seroczyńska, Jarosław Skokowski, Aleksandra Sejda, Jolanta Szade, Piotr Czapiewski, Wojciech Biernat, and Anna Zaczek. 2012. "CD73 Expression as a Potential Marker of Good Prognosis in Breast Carcinoma." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM* 20 (2): 103–7. <https://doi.org/10.1097/PAI.0B013E3182311D82>.
- Surprenant, A, F Rassendren, E Kawashima, RA North, and G Buell. 1996. "The Cytolytic P2Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2X Receptor (P2X7)." *Science (New York, N.Y.)* 272 (5262): 735–38. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5262.735>.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, and Jenny P.-Y. Ting. 2019. "The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics." *Nature Reviews Immunology* 2019 19:8 19 (8): 477–89. <https://doi.org/10.1038/S41577-019-0165-0>.
- Syberg, Susanne, Solveig Petersen, Jens-Erik Beck Jensen, Alison Gartland, Jenni Teilmann, Iain

- Chessell, Thomas H. Steinberg, Peter Schwarz, and Niklas Rye Jørgensen. 2012. "Genetic Background Strongly Influences the Bone Phenotype of P2X7 Receptor Knockout Mice." *Journal of Osteoporosis* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/391097>.
- Syberg, Susanne, Peter Schwarz, Solveig Petersen, Thomas H. Steinberg, Jens-Erik Beck Jensen, Jenni Teilmann, and Niklas Rye Jørgensen. 2012. "Association between P2X7 Receptor Polymorphisms and Bone Status in Mice." *Journal of Osteoporosis* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/637986>.
- Synnestvedt, Kristin, Glenn T. Furuta, Katrina M. Comerford, Nancy Louis, Jorn Karhausen, Holger K. Eltzschig, Karl R. Hansen, Linda F. Thompson, and Sean P. Colgan. 2002. "Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulation by Hypoxia-Inducible Factor-1 Mediates Permeability Changes in Intestinal Epithelia." *The Journal of Clinical Investigation* 110 (7): 993. <https://doi.org/10.1172/JCI15337>.
- Takenaka, Maisa C., Robson, Quintana FJ, Maisa C. Takenaka, Simon Robson, and Francisco J. Quintana. 2016. *Regulation of the T Cell Response by CD39*. Vol. 37. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/27236363/>.
- Tanha, Jamshid, Ping Xu, Zhigang Chen, Feng Ni, Howard Kaplan, Saran A. Narang, and C. Roger MacKenzie. 2001. "Optimal Design Features of Camelized Human Single-Domain Antibody Libraries." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (27): 24774–80. <https://doi.org/10.1074/JBC.M100770200>.
- Tatham, Peter E.R., and Manfred Lindau. 1990. "ATP-Induced Pore Formation in the Plasma Membrane of Rat Peritoneal Mast Cells." *Journal of General Physiology* 95 (3): 459–76. <https://doi.org/10.1085/JGP.95.3.459>.
- Taylor, Simon R. J., Mireya Gonzalez-Begne, Dorothy K. Sojka, Jill C. Richardson, Steven A. Sheardown, Stephen M. Harrison, Charles D. Pusey, Frederick W. K. Tam, and James I. Elliott. 2009. "Lymphocytes from P2X 7 -Deficient Mice Exhibit Enhanced P2X 7 Responses ." *Journal of Leukocyte Biology* 85 (6): 978–86. <https://doi.org/10.1189/jlb.0408251>.
- Taylor, Simon R.J., Clare M. Turner, James I. Elliott, John McDaid, Reiko Hewitt, Jennifer Smith, Matthew C. Pickering, et al. 2009. "P2X7 Deficiency Attenuates Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis." *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (6): 1275–81. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060559>.
- Taylor, SR, M Gonzalez-Begne, S Dewhurst, G Chimini, CF Higgins, JE Melvin, and JI Elliott. 2008. "Sequential Shrinkage and Swelling Underlie P2X7-Stimulated Lymphocyte Phosphatidylserine Exposure and Death." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (1): 300–308.

<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.1.300>.

Thomas, LM, and RD Salter. 2010. “Activation of Macrophages by P2X7-Induced Microvesicles from Myeloid Cells Is Mediated by Phospholipids and Is Partially Dependent on TLR4.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (6): 3740–49.

<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1001231>.

Tijink, Bernard M., Toon Laeremans, Marianne Budde, Marijke Stigter-Van Walsum, Torsten Dreier, Hans J. De Haard, C. René Leemans, and Guus A.M.S. Van Dongen. 2008. “Improved Tumor Targeting of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobodies through Albumin Binding: Taking Advantage of Modular Nanobody Technology.” *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (8): 2288–97. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2384>.

Todd, Jennifer N., Wenny Poon, Valeriya Lyssenko, Leif Groop, Brendan Nichols, Michael Wilmot, Simon Robson, et al. 2015. “Variation in Glucose Homeostasis Traits Associated With P2RX7 Polymorphisms in Mice and Humans.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (5): E688. <https://doi.org/10.1210/JC.2014-4160>.

Tomasinsig, Linda, Cinzia Pizzirani, Barbara Skerlavaj, Patrizia Pellegatti, Sara Gulinelli, Alessandro Tossi, Francesco Di Virgilio, and Margherita Zanetti. 2008. “The Human Cathelicidin LL-37 Modulates the Activities of the P2X7 Receptor in a Structure-Dependent Manner.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (45): 30471–81. <https://doi.org/10.1074/JBC.M802185200>.

Trabanelli, Sara, Darina Očadlíková, Sara Gulinelli, Antonio Curti, Valentina Salvestrini, Rodolfo de Paula Vieira, Marco Idzko, Francesco Di Virgilio, Davide Ferrari, and Roberto M. Lemoli. 2012. “Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4⁺ T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (3): 1303–10. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1103800>.

Trautmann, A. 2009. “Extracellular ATP in the Immune System: More than Just a ‘Danger Signal.’” *Science Signaling* 2 (56). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.256PE6>.

Tsukimoto, Mitsutoshi, Hitoshi Harada, Akira Ikari, and Kuniaki Takagi. 2005. “Involvement of Chloride in Apoptotic Cell Death Induced by Activation of ATP-Sensitive P2X7 Purinoceptor.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (4): 2653–58. <https://doi.org/10.1074/JBC.M411072200>.

Tsukimoto, Mitsutoshi, Machiko Maehata, Hitoshi Harada, Akira Ikari, Kuniaki Takagi, and Masakuni Degawa. 2006. “P2X7 Receptor-Dependent Cell Death Is Modulated during Murine T Cell Maturation and Mediated by Dual Signaling Pathways.” *The Journal of Immunology* 177 (5): 2842–50. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.5.2842>.

Turner, Clare M., Frederick W.K. Tam, P. C.Ping Chin Lai, Ruth M. Tarzi, G. Burnstock, Charles D.

- Pusey, H. Terence Cook, and Robert J. Unwin. 2007. "Increased Expression of the Pro-Apoptotic ATP-Sensitive P2X7 Receptor in Experimental and Human Glomerulonephritis." *Nephrology Dialysis Transplantation* 22 (2): 386–95. <https://doi.org/10.1093/NDT/GFL589>.
- Ulrich, Henning, Mariusz Z. Ratajczak, Gabriela Schneider, Elena Adinolfi, Elisa Orioli, Enéas G. Ferrazoli, Talita Glaser, et al. 2018. "Kinin and Purine Signaling Contributes to Neuroblastoma Metastasis." *Frontiers in Pharmacology* 9 (MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00500>.
- Vajjhala, Parimala R., Ruth E. Mirams, and Justine M. Hill. 2012. "Multiple Binding Sites on the Pyrin Domain of ASC Protein Allow Self-Association and Interaction with NLRP3 Protein *." *Journal of Biological Chemistry* 287 (50): 41732–43. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.381228>.
- Vaupel, Peter, and Arnulf Mayer. 2016. "Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 876: 177. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22.
- Vaupel, Peter, and Gabriele Multhoff. 2017. "Accomplices of the Hypoxic Tumor Microenvironment Compromising Antitumor Immunity: Adenosine, Lactate, Acidosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Potassium Ions, and Phosphatidylserine." *Frontiers in Immunology* 8 (DEC): 1887. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01887/BIBTEX>.
- Vázquez-Cuevas, Francisco G, Angélica S Martínez-Ramírez, Leticia Robles-Martínez, Edith Garay, Alejandro García-Carrancá, Delia Pérez-Montiel, Carolina Castañeda-García, and Rogelio O Arellano. 2014. "Paracrine Stimulation of P2X7 Receptor by ATP Activates a Proliferative Pathway in Ovarian Carcinoma Cells." *J. Cell. Biochem* 115: 1955–66. <https://doi.org/10.1002/jcb.24867>.
- Veit, Martin, Katharina Isabelle Koyro, Björn Ahrens, Florian Bleibaum, Martin Munz, Hagen Rövekamp, Jörg Andrä, et al. 2018. "Anoctamin-6 Regulates ADAM Sheddase Function." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1865 (11 Pt A): 1598–1610. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.08.011>.
- Vergani, A, S Tezza, F D'Addio, C Fotino, K Liu, M Niewczas, R Bassi, et al. 2013. "Long-Term Heart Transplant Survival by Targeting the Ionotropic Purinergic Receptor P2X7." *Circulation* 127 (4): 463–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123653>.
- Vergani, Andrea, Carmen Fotino, Francesca D'Addio, Sara Tezza, Michele Podetta, Francesca Gatti, Melissa Chin, et al. 2013. "Effect of the Purinergic Inhibitor Oxidized ATP in a Model of Islet Allograft Rejection." *Diabetes* 62 (5): 1665–75. <https://doi.org/10.2337/DB12-0242>.
- Vieira, Cátia, Maria Teresa Magalhães-Cardoso, Fátima Ferreirinha, Isabel Silva, Ana Sofia Dias, Julie Pelletier, Jean Sévigny, and Paulo Correia-De-Sá. 2014. "Feed-Forward Inhibition of Cd73

- and Upregulation of Adenosine Deaminase Contribute to the Loss of Adenosine Neuromodulation in Postinflammatory Ileitis.” *Mediators of Inflammation* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/254640>.
- Vijayan, Dipti, Arabella Young, Michele W.L. Teng, and Mark J. Smyth. 2017. “Targeting Immunosuppressive Adenosine in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 17 (12): 709–24. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>.
- Virgilio, F. Di, and E. Adinolfi. 2017. “Extracellular Purines, Purinergic Receptors and Tumor Growth.” *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>.
- Virgilio, Francesco Di, Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi, and Elena Adinolfi. 2018. “Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment.” *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>.
- Virgilio, Francesco Di, Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi, Elena Adinolfi, Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi, and Elena Adinolfi. 2018. “Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment.” *Nature Reviews Cancer* 18 (10): 601–18. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>.
- Virgilio, Francesco Di, Diego Dal Ben, Alba Clara Sarti, Anna Lisa Giuliani, and Simonetta Falzoni. 2017. “The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation.” *Immunity* 47 (1): 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.
- Virgilio, Francesco Di, Simonetta Falzoni, Anna Lisa Giuliani, and Elena Adinolfi. 2016. “P2 Receptors in Cancer Progression and Metastatic Spreading.” *Current Opinion in Pharmacology* 29 (August): 17–25. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2016.05.001>.
- Virgilio, Francesco Di, Anna L. Giuliani, Valentina Vultaggio-Poma, Simonetta Falzoni, and Alba C. Sarti. 2018. “Non-Nucleotide Agonists Triggering P2X7 Receptor Activation and Pore Formation.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (FEB): 39. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00039>.
- Virgilio, Francesco Di, Günther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2018. “The Elusive P2X7 Macropore.” *Trends in Cell Biology* 28 (5): 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.005>.
- Virgilio, Francesco Di, Yong Tang, Alba Clara Sarti, and Marco Rossato. 2020. “A Rationale for Targeting the P2X7 Receptor in Coronavirus Disease 19.” *British Journal of Pharmacology* 177 (21): 4990–94. <https://doi.org/10.1111/BPH.15138>.
- Virginio, C, A MacKenzie, FA Rassendren, RA North, and A Surprenant. 1999. “Pore Dilation of Neuronal P2X Receptor Channels.” *Nature Neuroscience* 2 (4): 315–21. <https://doi.org/10.1038/7225>.

- Vultaggio-Poma, Valentina, Simonetta Falzoni, Giada Salvi, Anna Lisa Giuliani, and Francesco Di Virgilio. 2022. "Signalling by Extracellular Nucleotides in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1869 (5): 119237. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119237>.
- Walker, Lucy S.K., and David M. Sansom. 2015. "Confusing Signals: Recent Progress in CTLA-4 Biology." *Trends in Immunology* 36 (2): 63. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2014.12.001>.
- Walunas, Theresa L., Deborah J. Lenschow, Christina Y. Bakker, Peter S. Linsley, Gordon J. Freeman, Jonathan M. Green, Craig B. Thompson, and Jeffrey A. Bluestone. 1994. "CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation." *Immunity* 1 (5): 405–13. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X).
- Wan, Han-Xing, Jian-Hong Hu, Rei Xie, Shi-Ming Yang, Hui Dong, Han-Xing Wan, Jian-Hong Hu, Rei Xie, Shi-Ming Yang, and Hui Dong. 2016. "Important Roles of P2Y Receptors in the Inflammation and Cancer of Digestive System." *Oncotarget* 7 (19): 28736–47. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7518>.
- Wang, B, and R. Sluyter. 2013. "P2X7 Receptor Activation Induces Reactive Oxygen Species Formation in Erythroid Cells." *Purinergic Signalling* 9 (1): 101–12. <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9335-2>.
- Wang, Dan, Phillip W.L. Tai, and Guangping Gao. 2019. "Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery." *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (5): 358–78. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>.
- Wang, Long, Jie Fan, Linda F. Thompson, Yi Zhang, Tahiro Shin, Tyler J. Curiel, and Bin Zhang. 2011. "CD73 Has Distinct Roles in Nonhematopoietic and Hematopoietic Cells to Promote Tumor Growth in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2371–82. <https://doi.org/10.1172/JCI45559>.
- Wang, X, G Arcuino, T Takano, J Lin, WG Peng, P Wan, P Li, et al. 2004. "P2X7 Receptor Inhibition Improves Recovery after Spinal Cord Injury." *Nature Medicine* 10 (8): 821–27. <https://doi.org/10.1038/NM1082>.
- Wang, Xuan, Yunsheng Li, Yanrong Qian, Yanyang Cao, Pratik Shriwas, Haiyun Zhang, and Xiaozhuo Chen. 2017. "Extracellular ATP, as an Energy and Phosphorylating Molecule, Induces Different Types of Drug Resistances in Cancer Cells through ATP Internalization and Intracellular ATP Level Increase." *Oncotarget* 8 (50): 87860–77. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21231>.
- Wang, Yidan, Isabelle Martins, Yuting Ma, Oliver Kepp, Lorenzo Galluzzi, and Guido Kroemer.

2013. “Autophagy-Dependent ATP Release from Dying Cells via Lysosomal Exocytosis.” *Autophagy* 9 (10): 1624–25. <https://doi.org/10.4161/AUTO.25873>.
- Wang, Z., H. I. Ma, J. Li, L. Sun, J. Zhang, and X. Xiao. 2003. “Rapid and Highly Efficient Transduction by Double-Stranded Adeno-Associated Virus Vectors in Vitro and in Vivo.” *Gene Therapy* 2003 10:26 10 (26): 2105–11. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302133>.
- Wanhainen, Kelsey M, Stephen C Jameson, and Henrique Borges. 2019. “Self-Regulation of Memory CD8 T Cell Metabolism through Extracellular ATP Signaling.” *Immunometabolism*, 3–8. <https://doi.org/10.20900/immunometab20190009>.
- Wanner, Nicola, Thomas Eden, Nastassia Liaukouskaya, and Friedrich Koch-Nolte. 2021. “Nanobodies: New Avenue to Treat Kidney Disease.” *Cell and Tissue Research* 385 (2): 445. <https://doi.org/10.1007/S00441-021-03479-8>.
- Waterhouse, Paul, Josef M. Penninger, Emma Timms, Andrew Wakeham, Arda Shahinian, Kelvin P. Lee, Craig B. Thompson, Henrik Griesser, and Tak W. Mak. 1995. “Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctla-4.” *Science (New York, N.Y.)* 270 (5238): 985–88. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5238.985>.
- Webb, TE, J Simon, BJ Krishek, AN Bateson, TG Smart, BF King, G Burnstock, and EA Barnard. 1993. “Cloning and Functional Expression of a Brain G-Protein-Coupled ATP Receptor.” *FEBS Letters* 324 (2): 219–25. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81397-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81397-I).
- Weber, Felix C., Philipp R. Esser, Tobias Müller, Jayanthi Ganesan, Patrizia Pellegatti, Markus M. Simon, Robert Zeiser, Marco Idzko, Thilo Jakob, and Stefan F. Martin. 2010. “Lack of the Purinergic Receptor P2X7 Results in Resistance to Contact Hypersensitivity.” *The Journal of Experimental Medicine* 207 (12): 2609. <https://doi.org/10.1084/JEM.20092489>.
- Wei, Linyu, Emily Caseley, Dongliang Li, and Lin-Hua Jiang. 2016. “ATP-Induced P2X Receptor-Dependent Large Pore Formation: How Much Do We Know?” *Frontiers in Pharmacology* 0 (JAN): 5. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2016.00005>.
- Wesolowski, Janusz, Vanina Alzogaray, Jan Reyelt, Mandy Unger, Karla Juarez, Mariela Urrutia, Ana Cauerhff, et al. 2009. “Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity.” *Medical Microbiology and Immunology* 198 (3): 157–74. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7>.
- Wiley, JS, R Chen, MJ Wiley, and GP Jamieson. 1992. “The ATP4- Receptor-Operated Ion Channel of Human Lymphocytes: Inhibition of Ion Fluxes by Amiloride Analogs and by Extracellular Sodium Ions.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 292 (2): 411–18. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90010-T](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90010-T).

- Wiley, JS, and GR Dubyak. 1989. "Extracellular Adenosine Triphosphate Increases Cation Permeability of Chronic Lymphocytic Leukemic Lymphocytes." *Blood* 73 (5): 1316–23. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V73.5.1316.1316>.
- Wilhelm, Konrad, Jayanthi Ganesan, Tobias Müller, Christoph Dürr, Melanie Grimm, Andreas Beilhack, Christine D. Kreml, et al. 2010. "Graft-versus-Host Disease Is Enhanced by Extracellular ATP Activating P2X7R." *Nature Medicine* 16 (12): 1434–39. <https://doi.org/10.1038/NM.2242>.
- Wilson, HL, SA Wilson, A Surprenant, and R A North. 2002. "Epithelial Membrane Proteins Induce Membrane Blebbing and Interact with the P2X7 Receptor C Terminus." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 34017–23. <https://doi.org/10.1074/JBC.M205120200>.
- Woehrle, T, L Yip, A Elkhail, Y Sumi, Y Chen, Y Yao, PA Insel, and WG Junger. 2010. "Pannexin-1 Hemichannel-Mediated ATP Release Together with P2X1 and P2X4 Receptors Regulate T-Cell Activation at the Immune Synapse." *Blood* 116 (18): 3475–84. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-04-277707>.
- Woo, Seng-Ryong Ryong, Mercedes B. Fuertes, Leticia Corrales, Stefani Spranger, Michael J. Furdyna, Michael Y.K. K Leung, Ryan Duggan, et al. 2014. "No Title." *Immunity* 41 (5): 830. [/pmc/articles/PMC4384884/](https://pmc/articles/PMC4384884/).
- Woods, Lucas T., Jean M. Camden, Josef M. Batek, Michael J. Petris, Laurie Erb, and Gary A. Weisman. 2012. "P2X7 Receptor Activation Induces Inflammatory Responses in Salivary Gland Epithelium." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 303 (7): C790. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00072.2012>.
- Wykes, Michelle N., Lynette Beattie, Gordon G. Macpherson, and Derek N. Hart. 2004. "Dendritic Cells and Follicular Dendritic Cells Express a Novel Ligand for CD38 Which Influences Their Maturation and Antibody Responses." *Immunology* 113 (3): 318–27. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2004.01968.X>.
- Xu, Dong, Doug McCarty, Alda Fernandes, Michael Fisher, R. J. Samulski, and R. L. Juliano. 2005. "Delivery of MDR1 Small Interfering RNA by Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus Vector." *Molecular Therapy* 11 (4): 523–30. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2004.12.019>.
- Xu, XJ, M Boumechache, LE Robinson, V Marschall, DC Gorecki, M Masin, and RD Murrell-Lagnado. 2012. "Splice Variants of the P2X7 Receptor Reveal Differential Agonist Dependence and Functional Coupling with Pannexin-1." *Journal of Cell Science* 125 (Pt 16): 3776–89. <https://doi.org/10.1242/JCS.099374>.

- Yan, Juming, Xian-Yang Li, Amelia Roman Aguilera, Christos Xiao, Celia Jacobberger-Foisac, Bianca Nowlan, Simon C. Robson, et al. 2020. "Control of Metastases via Myeloid CD39 and NK Cell Effector Function." *Cancer Immunology Research*, January, canimm.0749.2019. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0749>.
- Yan, Zonghe, Shuo Li, Zhaodong Liang, Melanija Tomić, and Stanko S. Stojilkovic. 2008. "The P2X7 Receptor Channel Pore Dilates under Physiological Ion Conditions." *The Journal of General Physiology* 132 (5): 563. <https://doi.org/10.1085/JGP.200810059>.
- Yang, Dahai, Yuan He, Raul Muñoz-Planillo, Qin Liu, and Gabriel Núñez. 2015. "Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock." *Immunity* 43 (5): 923–32. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.10.009>.
- Yang, Grace S., Michael Schmidt, Ziyang Yan, Jonathan D. Lindbloom, Thomas C. Harding, Brian A. Donahue, John F. Engelhardt, Robert Kotin, and Beverly L. Davidson. 2002. "Virus-Mediated Transduction of Murine Retina with Adeno-Associated Virus: Effects of Viral Capsid and Genome Size." *Journal of Virology* 76 (15): 7651–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.15.7651-7660.2002>.
- Yegutkin, Gennady G., Kaisa Auvinen, Pia Rantakari, Maija Hollmén, Marika Karikoski, Reidar Grénman, Kati Elima, Sirpa Jalkanen, and Marko Salmi. 2015. "Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 Enhances Endothelial Barrier Function and Sprouting in Blood but Not Lymphatic Vasculature." *European Journal of Immunology* 45 (2): 562–73. <https://doi.org/10.1002/EJI.201444856>.
- Yegutkin, Gennady G., Fumiko Marttila-Ichihara, Marika Karikoski, Jussi Niemelä, Juha P. Laurila, Kati Elima, Sirpa Jalkanen, and Marko Salmi. 2011. "Altered Purinergic Signaling in CD73-Deficient Mice Inhibits Tumor Progression." *European Journal of Immunology* 41 (5): 1231–41. <https://doi.org/10.1002/EJI.201041292>.
- Yegutkin, Gennady G., Sergei S. Samburski, and Sirpa Jalkanen. 2003. "Soluble Purine-Converting Enzymes Circulate in Human Blood and Regulate Extracellular ATP Level via Counteracting Pyrophosphatase and Phosphotransfer Reactions." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (10): 1328–30. <https://doi.org/10.1096/FJ.02-1136FJE>.
- Yegutkin, Gennady G., Sergei S. Samburski, Stefan P. Mortensen, Sirpa Jalkanen, and José Gonfzález-alonso. 2007. "Intravascular ADP and Soluble Nucleotidases Contribute to Acute Prothrombotic State during Vigorous Exercise in Humans." *The Journal of Physiology* 579 (Pt 2): 553–64. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2006.119453>.
- Yip, Linda, Tobias Woehrle, Ross Corriden, Mark Hirsh, Yu Chen, Yoshiaki Inoue, Vhe Ferrari, Paul

- A. Insel, and Wolfgang G. Junger. 2009a. "Autocrine Regulation of T-Cell Activation by ATP Release and P2X 7 Receptors." *FASEB Journal* 23 (6): 1685–93. <https://doi.org/10.1096/fj.08-126458>.
- . 2009b. "Autocrine Regulation of T-Cell Activation by ATP Release and P2X7 Receptors." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (6): 1685–93. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-126458>.
- Ylä-Herttuala, Seppo. 2012. "Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union." *Molecular Therapy* 20 (10): 1831. <https://doi.org/10.1038/MT.2012.194>.
- Young, Chris N.J., and Dariusz C. Górecki. 2018. "P2RX7 Purinoceptor as a Therapeutic Target-The Second Coming?" *Frontiers in Chemistry* 6 (JUN): 248. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00248>.
- Young, Christopher NJ, Anthony Sinadinos, Alexis Lefebvre, Philippe Chan, Stephen Arkle, David Vaudry, and Dariusz C Gorecki. 2015. "A Novel Mechanism of Autophagic Cell Death in Dystrophic Muscle Regulated by P2RX7 Receptor Large-Pore Formation and HSP90." *Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.4161/15548627.2014.994402* 11 (1): 113–30. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.994402>.
- Young, M T, P Pelegrin, and A Surprenant. 2006. "Identification of Thr283 as a Key Determinant of P2X7 Receptor Function." *British Journal of Pharmacology* 149 (3): 261. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706880>.
- Yu, Joanne L., Linda May, Vladimir Lhotak, Siranoush Shahrzad, Senji Shirasawa, Jeffrey I. Weitz, Brenda L. Coomber, Nigel Mackman, and Janusz W. Rak. 2005. "Oncogenic Events Regulate Tissue Factor Expression in Colorectal Cancer Cells: Implications for Tumor Progression and Angiogenesis." *Blood* 105 (4): 1734–41. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-05-2042>.
- Zhang, Haiyan, Dipti Vijayan, Xian-Yang Li, Simon C. Robson, Nishamol Geetha, Michele W. L. Teng, and Mark J. Smyth. 2019. "The Role of NK Cells and CD39 in the Immunological Control of Tumor Metastases." *OncotImmunology* 8 (6): e1593809. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593809>.
- Zhang, Lin, Jose R. Conejo-Garcia, Dionyssios Katsaros, Phyllis A. Gimotty, Marco Massobrio, Giorgia Regnani, Antonis Makrigiannakis, et al. 2003. "Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer." *The New England Journal of Medicine* 348 (3): 203–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA020177>.
- Zhang, Wen jun, Chen Luo, Chao Huang, Fan qin Pu, Jin feng Zhu, and Zheng ming Zhu. 2021.

- “PI3K/Akt/GSK-3 β Signal Pathway Is Involved in P2X7 Receptor-Induced Proliferation and EMT of Colorectal Cancer Cells.” *European Journal of Pharmacology* 899 (May).
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.174041>.
- Zhang, Xinge, and Guilin Li. 2019. “P2Y Receptors in Neuropathic Pain.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 186 (November): 172788.
<https://doi.org/10.1016/J.PBB.2019.172788>.
- Zhao, Jijun, Hongyue Wang, Chao Dai, Hongyang Wang, Hui Zhang, Yuefang Huang, Shuang Wang, Felicia Gaskin, Niansheng Yang, and Shu Man Fu. 2013. “P2X7 Blockade Attenuates Murine Lupus Nephritis by Inhibiting Activation of the NLRP3/ASC/Caspase 1 Pathway.” *Arthritis and Rheumatism* 65 (12): 3176–85. <https://doi.org/10.1002/ART.38174>.
- Zhi, Xiuling, Yingjian Wang, Xuerui Zhou, Jerry Yu, Rongrong Jian, Shaoxian Tang, Lianhua Yin, and Ping Zhou. 2010. “RNAi-Mediated CD73 Suppression Induces Apoptosis and Cell-Cycle Arrest in Human Breast Cancer Cells.” *Cancer Science* 101 (12): 2561–69.
<https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2010.01733.X>.
- Zhou, Yi, Mingjian Fei, Gu Zhang, Wei-Ching Ching Liang, WeiYu Yu Lin, Yan Wu, Robert Piskol, et al. 2020. “Blockade of the Phagocytic Receptor MerTK on Tumor-Associated Macrophages Enhances P2X7R-Dependent STING Activation by Tumor-Derived CGAMP.” *Immunity* 52 (2): 357-373.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.014>.
- Ziberi, Sihana, Mariachiara Zuccarini, Marzia Carluccio, Patricia Giuliani, Lucia Ricci-Vitiani, Roberto Pallini, Francesco Caciagli, Patrizia Di Iorio, and Renata Ciccarelli. 2019. “Upregulation of Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and P2X7 Receptors Is Associated to Increased Invasiveness Caused by P2X7 Receptor Stimulation in Human Glioblastoma Stem Cells.” *Cells* 2020, Vol. 9, Page 859 (1): 85. <https://doi.org/10.3390/CELLS9010085>.
- Zimmermann, Herbert, Matthias Zebisch, and Norbert Sträter. 2012. “Cellular Function and Molecular Structure of Ecto-Nucleotidases.” *Purinergic Signalling* 8 (3): 437–502.
<https://doi.org/10.1007/S11302-012-9309-4>.

Figures :

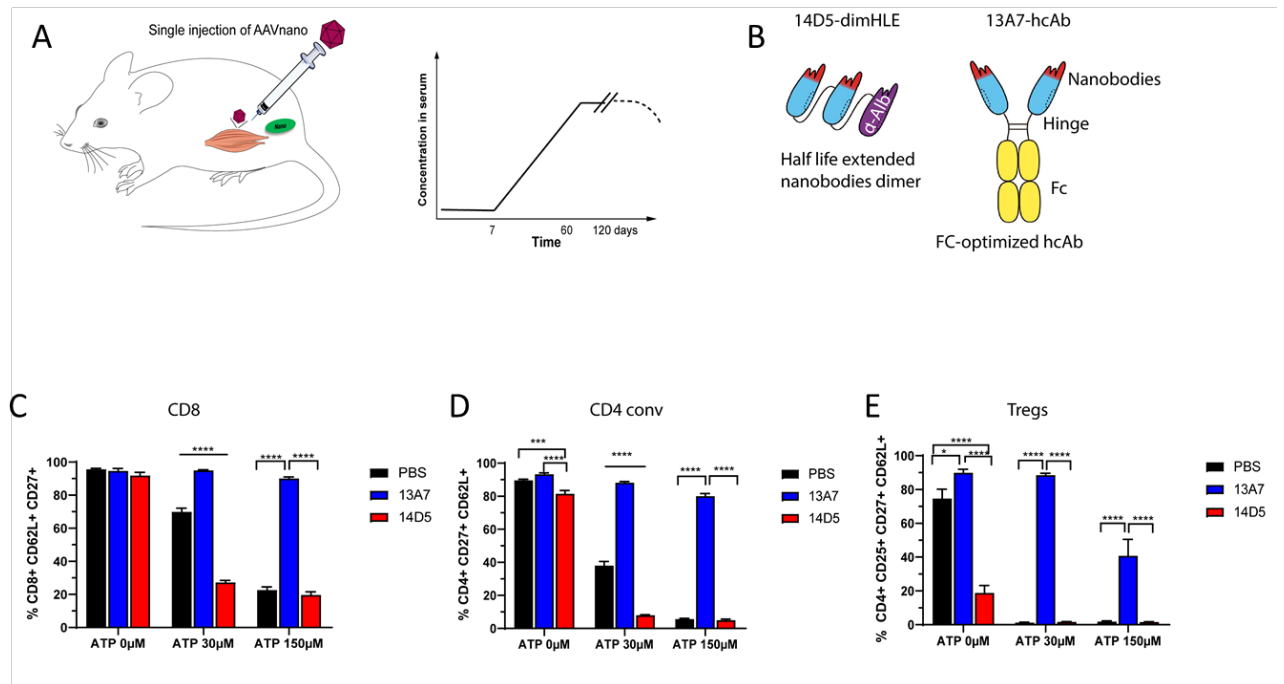


Figure 1: AAVnano methodological approach used to block or to activate P2X7 in vivo

A) AAVnano methodology approach is based on the single i.m. injection of AAV1 vectors coding for the corresponding nanobodies-based biologics. This is anticipated to induce long-term and stable in vivo production of the designed biologics in vivo. **B)** Schemes illustrating the format of the different nanobody-based biologics used in this work. The 14D5-dimHLE is composed of a dimer of the P2X7-potentiating 14D5 nanobody, coupled to third anti-albumin nanobody (Alb8) conferring extended half-life (HLE). The 13A7-hcAb is composed of an antagonistic nanobody targeting P2X7, coupled to the hinge and the Fc-region of a mouse IgG1, carrying the "LSF" mutations (T252L, T254S, T256F) to confer higher affinity to the neonatal Fc receptor (FcRn) involved in antibody longer half-life in vivo (Ghetie et al. 1997). **C-E)** Evaluation of the ability of the AAVnano vectors to induce functional modulation (i.e. block or activate) of P2X7 functions in vivo, were assessed 20 days after their i.m. injection. For that, blood samples were collected and incubated in vitro with 30 or 150 μM of ATP, or left untreated. P2X7-dependent shedding of CD62L and CD27 were evaluated at the surface of CD8⁺, CD4⁺CD25⁻ (CD4 conv), and CD4⁺CD25⁺ (Tregs) lymphocyte subsets, known to express different level of P2X7 and to display increasing sensitivity to ATP. n=7 mice in each group of mice.

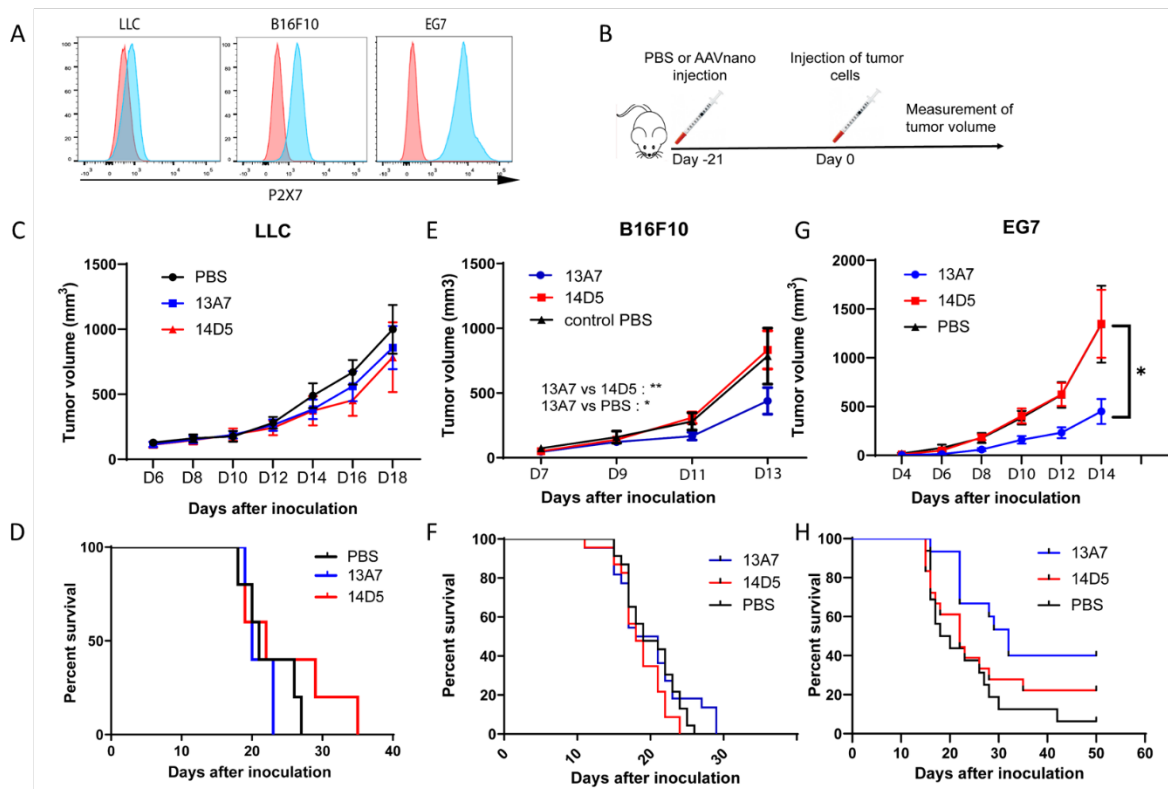


Figure 2: Antagonistic nanobody-based biologics inhibit tumor growth in tumor cell lines expressing P2X7

A) P2X7 surface expression level in the indicated tumor cell lines, used in our tumor models, have been evaluated by flow cytometry using a fluorochrome-conjugated P2X7-specific antibody (blue histograms) and compared to the background staining obtained using a fluorochrome-coupled isotype control antibody (red histograms). **B)** Scheme of the protocol used to evaluate the effect of P2X7-blocking and P2X7-potentiating biologics on tumor growth in vivo. Mice were injected i.m. with 10^{11} gv/mouse of the AAV vectors coding for each nanobody-based biologics, namely AAV-13A7 (coding for the P2X7 blocking biologics), or AAV-14D5 (coding for the P2X7 potentiating biologics). 21 days later, mice were inoculated with the tumor cells line in the right flank of the animal and tumor volumes were monitored over time. **C, E, G)** Mean tumor volumes in each group of animals are shown, in the mice injected with the LLC carcinoma, B16F10 melanoma, or EG7 thymoma as indicated. **D, F, H)** Corresponding survival curves are shown for each tumor models. The numbers of animal were at least equal to 10 mice, in each group, and experiment were at least repeated 2 times with similar results. The statistical analyses of the mean tumor volume were performed using two-way ANOVA. The statistical analysis of the survival was performed using Log-Rank tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

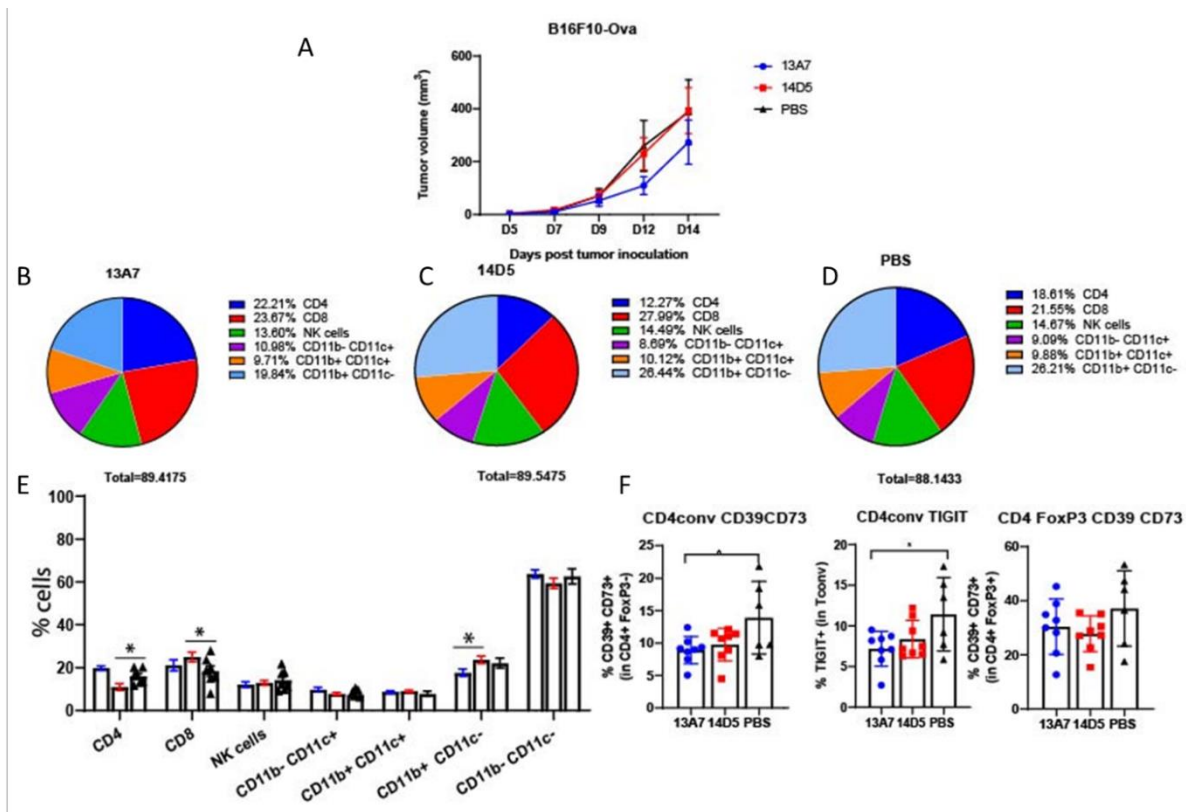


Figure 3: Modification of the composition of the immune infiltrates within the tumor microenvironment in response to the biologics targeting P2X7

Mean tumor volume in the melanoma B16F10-Ova model. B, C and D) repartition of tumor infiltrating cells in 13A7 group, 14D5 group and PBS group. E) Percentage of cells in the 13A7 group in blue, 14D5 in red and PBS in black. F) Expression of the double positive CD39 and CD73 cells within conventional CD4⁺ T cells and FoxP3⁺ Tregs cells. Expression of TIGIT in conventional CD4⁺ T cells. N = 7 per group. The statistical analysis of the mean tumor volume was performed using two-way ANOVA. The statistical analysis of the tumor infiltrating cells between experimental groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). *p < 0.05

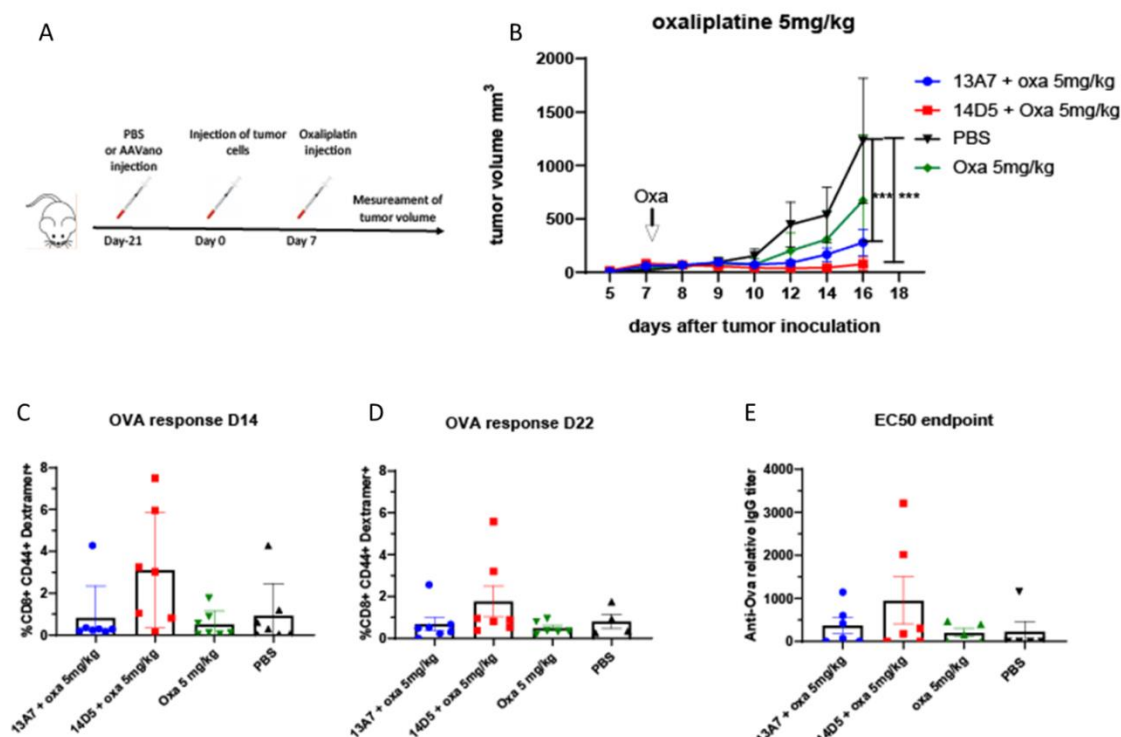


Figure 4: combination of the AAVnano methodology with a chemotherapy agent, oxaliplatin.

Schematic protocol for the in vivo experiment. Injection of the corresponding AAVnano in the gastrocnemius of the mice, 21 days later subcutaneous injection of the B16F10 -ova cells. B) Mean tumor volume for EG7 tumor model. N=7 mice per group. Oxaliplatin (5mg/kg/mouse) was injected once a day since day seven after tumor inoculation. C and D) CD8+ cells responses against Ovalbumin (OVA) at D14 and D22. N= 7 mice per group. E) Anti OVA relative IgG titer on day 23 after tumor inoculation. N= 7 mice per group. The statistical analysis of the mean tumor volume was performed using two-way ANOVA. The statistical analysis of the survival was performed using Log-Rank tests.

***p < 0.001

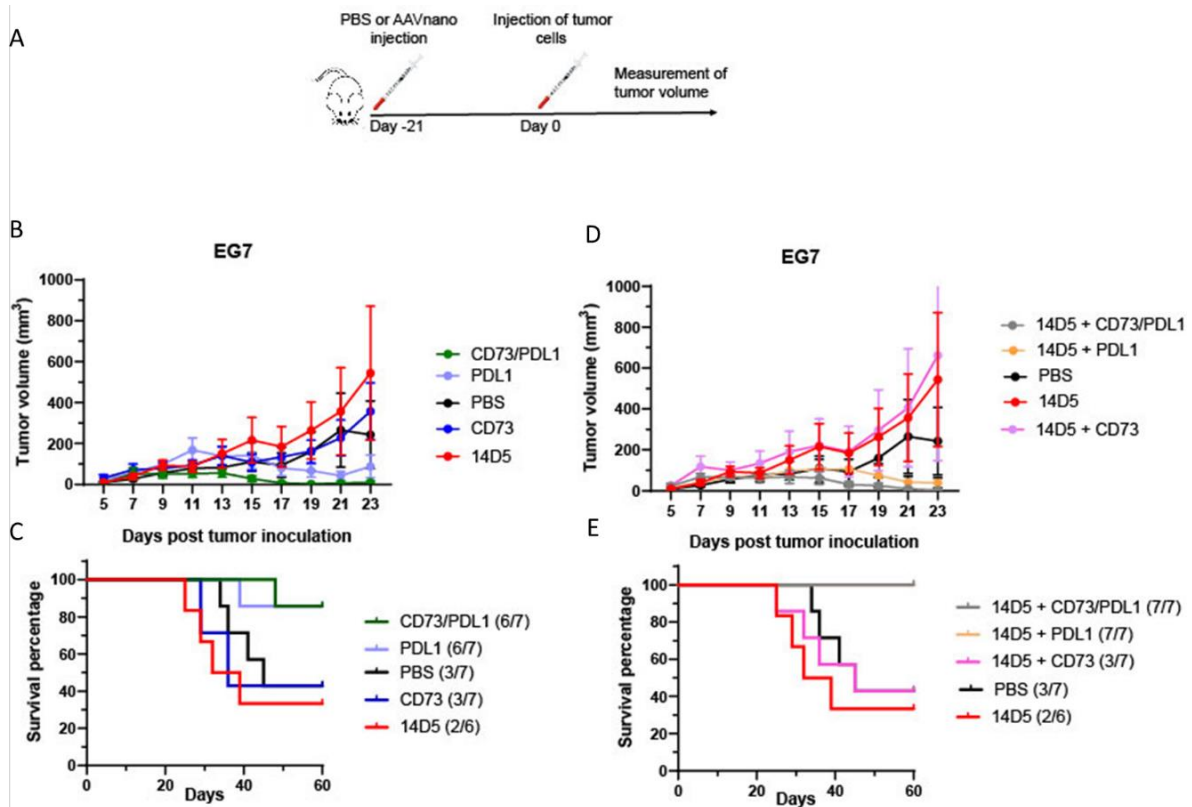


Figure 5: effect of the combination of the AAVnano methodology with AAVnano coding for anti-CD73 or anti-PD-L1 and the bispecific anti-CD73/PD-L1 in the thymoma model EG7.

Injection of AAVnano coding for the corresponding nanobodies in the gastrocnemius (for 14D5-dimHLE) and in quadriceps (for CD73-dimHLE, PD-L1-dimHLE and CD73/PD-L1-HLE). 21 days later, subcutaneous injection of the EG7 cells in the right flank of the mice. N= 7 mice per group. B and C) mean tumor volume and the corresponding survival curve. E and F) mean tumor volume and the corresponding survival curve. The statistical analysis of the mean tumor volume was performed using two-way ANOVA. The statistical analysis of the survival was performed using Log-Rank tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

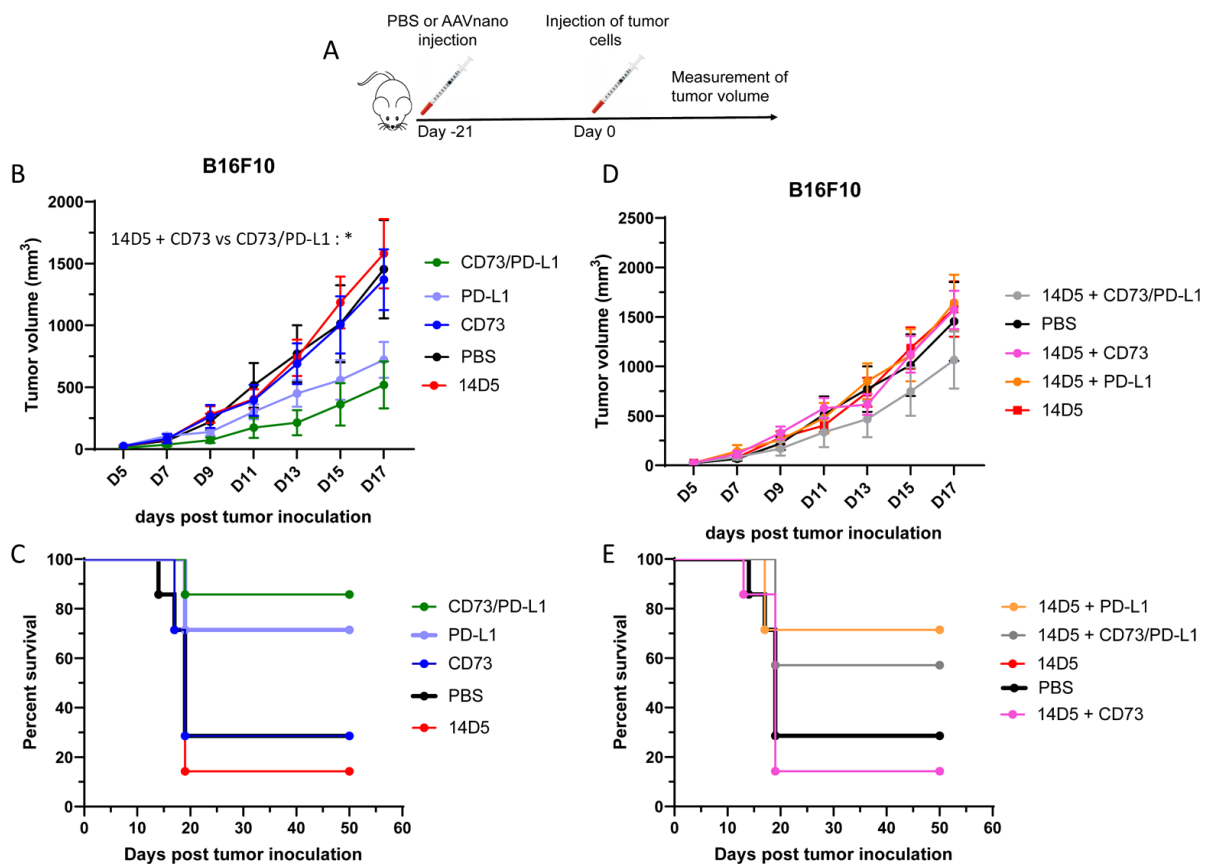
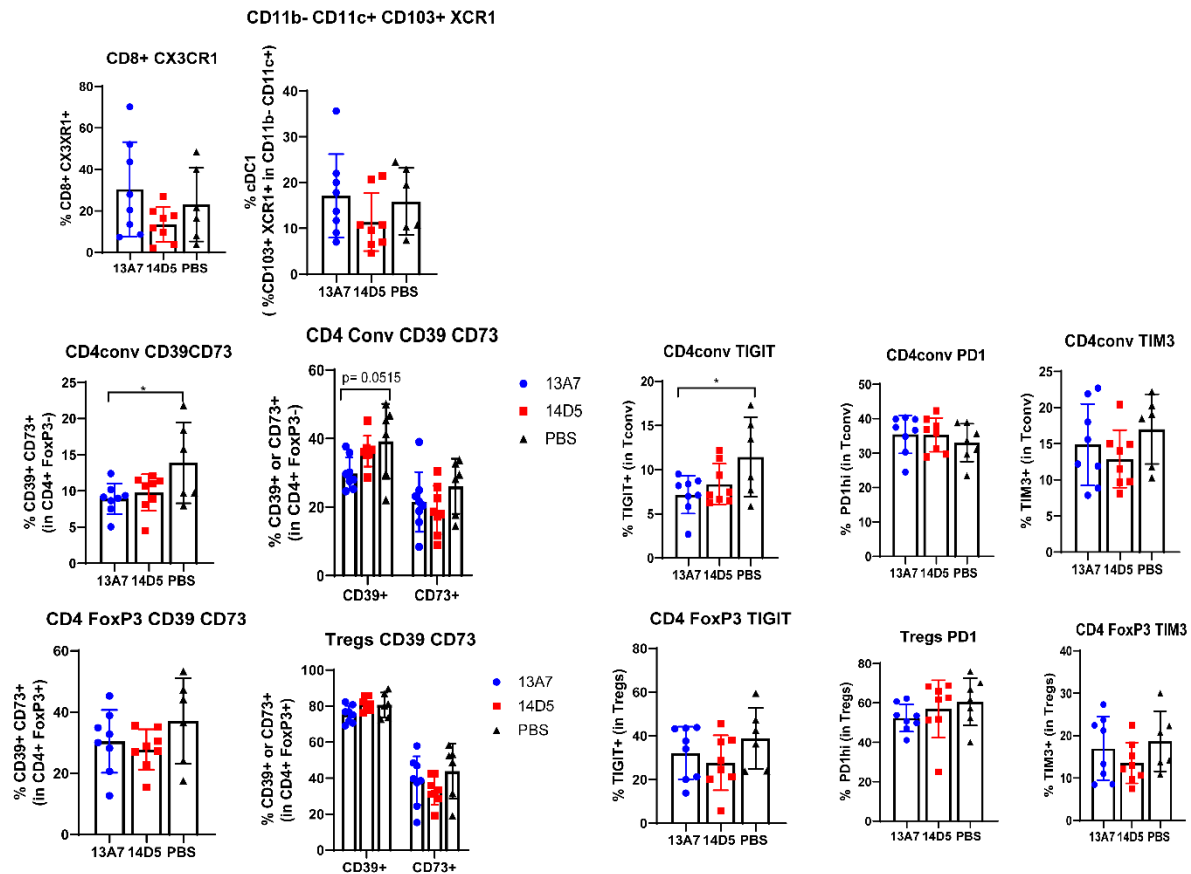


Figure 6: effect of the combination of the AAVnano methodology with AAVnano coding for anti-CD73 or anti-PD-L1 and the bispecific anti-CD73/PD-L1 in the melanoma B16F10 model.

Injection of AAVnano coding for the corresponding nanobodies in the gastrocnemius for 14D5 and in the quadriceps for CD73, PD-L1 and CD73/PD-L1. 21 days later, subcutaneous injection of the B16F10 cells was performed in the right flank of the mice. N= 7 mice per group. B and C mean tumor volume and the corresponding survival curve. E and F) mean tumor volume and the corresponding survival curve. The statistical analysis of the mean tumor volume was performed using two-way ANOVA. The statistical analysis of the survival was performed using Log-Rank tests. * $p < 0.05$



Supplemental figure S1 : phenotype of the TIL

As for figure 3, the composition and phenotype of the tumor infiltrates in the B16F10 tumor model were evaluated in the different groups treated with 13A7-hcAb (blue), or with 14D5-DimHLE (red), or treated only with PBS (black) as a negative control. The E) Percentage of cells in the 13A7 group in blue, 14D5 in red and PBS in black. n = 7 per group and the statistical analysis of the difference between the groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). *p < 0.05

Discussion

L'ATP relarguée dans l'espace extracellulaire représente un signal de danger qui agit par deux principales familles de récepteurs membranaires, les récepteurs couplés à des protéines G nommés récepteurs P2Y et des canaux ioniques nommés récepteurs P2X (Burnstock 2006). Parmi cette dernière famille, P2X7 est un récepteur homotrimérique qui a suscité et suscite toujours un grand intérêt dans les domaines de l'inflammation et du cancer. Le récepteur P2X7 est un canal cationique non sélectif, exprimé à la surface de diverses cellules immunitaires, en particulier les monocytes, les macrophages et les Tregs (Bartlett, Stokes, and Sluyter 2014; Di Virgilio et al. 2017). P2X7 joue un rôle central dans l'inflammation en raison de sa capacité à activer l'inflammasome NLRP3 et à engendrer la libération d'IL-1 β et d'IL-18 (Adinolfi et al. 2018). Son activation prolongée conduit à la formation d'un macropore membranaire non sélectif permettant l'entrée de molécules allant jusqu'à 900 Da. Cette dépolarisation massive conduit à la mort cellulaire. P2X7 peut ainsi entraîner une perturbation majeure de l'équilibre ionique intracellulaire, des activités et fonctions cellulaires et influence le destin cellulaire. Dans le contexte tumoral, on a attribué à P2X7 des rôles divers et contrastés, comme moteur de la croissance des cellules cancéreuses (Di Virgilio, Sarti, et al. 2018) et de la dissémination métastatique, ou comme promoteur de rejet des tumeurs *via* des réponses immunitaires antitumorales (Adinolfi et al. 2015; 2019). Dans le but d'évaluer le rôle de P2X7 dans l'inflammation aiguë et chronique ainsi que dans le cancer, nous avons développé la méthodologie AAVnano. Elle est basée sur l'injection d'une dose unique d'un vecteur viral AAV codant pour des constructions basées sur des nanobodies ciblant P2X7. Deux constructions ont été évaluées, 14D5-dimHLE potentialisant P2X7 en présence d'ATP et 13A7-hcAb bloquant son activité.

Avantages et inconvénients de la méthodologie AAVnano

Dans un premier temps, nous avons testé *in vivo* quatre constructions basées sur des nanobodies (13A7, 14D5, 8G11, 1C81) ciblant P2X7 ainsi que deux formats pour chacune de ces constructions (Dim-HLE et hcAb). Ceci nous a permis de sélectionner deux constructions 13A7-hcAb bloquant efficacement P2X7 et 14D5-dimHLE potentialisant P2X7. 14D5-dimHLE est un dimère de nanobodies 14D5 couplé à un nanobody anti-albumine permettant d'augmenter sa demi-vie *in vivo*. 13A7-hcAb est quant à lui couplé à la région Fc d'une IgG1 portant une mutation LSF conférant une meilleure affinité pour le récepteur FcRn, et permettant ainsi d'augmenter leur demi-vie. Étonnamment la construction 14D5-hcAb, également évaluée, s'est comporté comme un antagoniste partiel sur l'activité de P2X7 plutôt que comme un modulateur positif de son activité. Ces résultats indiquent probablement que la réticulation du récepteur trimérique à la surface cellulaire est susceptible d'inhiber son activité, ou d'induire son endocytose. De telles hypothèses restent

cependant à confirmer. Nous avons également étudié la durabilité de l'expression *in vivo* de ces constructions en étudiant la modulation de l'activité fonctionnelle de P2X7 qu'elles induisent au cours du temps et jusqu'à 120 jours après injection des AAV codant pour ces constructions. Ces résultats nous ont permis de démontrer que l'expression *in vivo* de nos constructions est durable et permet de moduler efficacement le récepteur P2X7 jusqu'à au moins 120 jours post-administration des AAV. Sur le plan des concentrations sériques obtenues *in vivo*, les titrations réalisées montrent que les molécules biologiques produites *in vivo* atteignent des concentrations situées entre 30 et 50 µg/mL 14 à 21 jours post administration des AAV, puis progressent pour atteindre entre 30 et 120 jours des concentrations qui se stabilisent autour de 100 µg/mL. Ces résultats suggèrent que l'administration des AAV *in vivo*, n'induit pas de réponses immunitaires anti-transgènes et anti-AAV. Se pose cependant la question du devenir des cellules cibles et du devenir des récepteurs ciblés par cette méthodologie. Le suivi et la fréquence et du nombre de principales populations lymphocytaires n'a pas montré de déplétion des cellules cibles ni de changement phénotypique mesurable. Il reste à évaluer si les récepteurs cibles peuvent être internalisés par une activation chronique.

L'utilisation de la méthodologie AAVnano présente divers avantages par rapport à d'autres méthodologies. En comparaison aux molécules chimiques, nos constructions basées sur des nanobodies offrent une meilleure spécificité. En effet, les nanobodies et les anticorps en général sont connus pour leur excellente capacité à distinguer des cibles proches appartenant à une même famille de protéines. Ceci peut prévenir la présence d'effets secondaires. Les nanobodies produits par les camélidés apportent de nombreux avantages incluant leur petite taille, leur haute stabilité, leur haute solubilité et leur excellente pénétration dans les tissus *in vivo*. Les nanobodies peuvent facilement être liés génétiquement à des domaines Fc, à d'autres nanobodies, à des tags peptidiques ou à des toxines et peuvent être conjugués chimiquement à un site spécifique à des médicaments, des radionucléides, des photosensibilisateurs et des nanoparticules. Ces propriétés les rendent particulièrement adaptés au ciblage spécifique et efficace des tumeurs *in vivo*. Dans ce travail de thèse, les constructions basées sur des nanobodies sélectionnées se lient spécifiquement au récepteur P2X7 de la souris et ne reconnaissent pas les paralogues les plus proches P2X4 et P2X1 (Danquah et al. 2016). Toutefois, la spécificité élevée et l'absence de réactivité croisée avec l'orthologue du récepteur P2X7 de d'autres espèces peuvent limiter l'utilisation d'une construction basée sur des nanobodies entre espèces dans les études translationnelles. Une limitation similaire a également été observée avec des composés chimiques qui présentent parfois des effets modulateurs et des propriétés pharmacologiques différents chez l'homme et chez d'autres animaux. De plus, ces constructions peuvent atteindre des cibles plus petites que les anticorps, ils ont en effet, une meilleure pénétration dans les tissus et peuvent atteindre et moduler des sites catalytiques, traverser la barrière hémato-encéphalique ou le

microenvironnement tumoral. Ces nanobodies peuvent également être facilement modifiés afin notamment d'augmenter leur demi-vie ou d'être couplé à d'autres nanobodies afin de former une construction bispécifique.

Les vecteurs viraux recombinants AAV sont couramment utilisés en thérapie génique et représentent une approche efficace et sûre pour transférer un gène d'intérêt dans les cellules musculaires et pour obtenir une production systémique *in situ* à long terme d'une protéine transgénique (Balazs et al. 2014; Saunders et al. 2015). Dans nos expériences, une seule injection intramusculaire d'AAV (10^{11} génomes viraux par souris) codant pour nos constructions basées sur des nanobodies était suffisante pour obtenir des niveaux systémiques efficaces de ces constructions bloquantes ou potentialisatrices spécifiques de P2X7. La méthodologie AAVnano permet d'éviter le recours à l'administration quotidienne de constructions basées sur des nanobodies recombinantes correspondants. On peut soutenir que cela peut également fournir une pharmacocinétique plus favorable en maintenant une concentration saturante stable de la construction désirée *in vivo* et en évitant les cycles de pic/déclin obtenus après l'injection répétée d'un anticorps recombinant. Ceci peut favoriser une meilleure biodisponibilité et une meilleure pénétration tissulaire. Cependant, comme la production systémique de protéines transgéniques *in situ* à l'aide de vecteurs AAV est connue pour suivre une cinétique lente, avec l'apparition de la protéine d'intérêt une à deux semaines après la transduction, la phase d'équilibre n'est probablement pas obtenue *in vivo* avant deux à trois semaines. Par conséquent, la méthodologie AAVnano est destinée à être utilisée dans des modèles prophylactiques, comme dans la présente étude, plutôt que dans un cadre thérapeutique.

De multiples études suggèrent un rôle de l'ATPé dans la physiopathologie de maladies inflammatoires dont les maladies inflammatoires de l'intestin. P2X7 est exprimé sur les cellules immunitaires et non immunitaires du tractus gastro-intestinal (Cesaro et al. 2010). Une surexpression de P2X7 a été observée dans l'épithélium et dans la lamina propria (macrophages et cellules dendritiques) de patients atteints par la maladie de Crohn, ce qui suggère son rôle dans la physiopathologie de la maladie (Neves et al. 2014). De même, il a été rapporté que l'expression de P2X7 était augmentée chez les rats soumis au modèle aiguë de colite induite par le sulfate de dextran-sodium (DSS) (Saber et al. 2021). De plus, il a été démontré précédemment que les souris déficientes pour P2X7 présentaient une inflammation réduite de la muqueuse dans les modèles de colites induites par le DSS ou par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (Cesaro et al. 2010; Saber et al. 2021; Hofman et al. 2015). Ces données suggèrent que P2X7 pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans les maladies inflammatoires telles que les maladies intestinales inflammatoires. Ce travail de thèse nous a d'abord permis de démontrer que la méthodologie AAVnano est fonctionnelle dans un modèle de colite aiguë et chronique. En effet, cette méthodologie permet, au

moyen d'une seule injection, de moduler la fonction de P2X7 à long terme et évite ainsi l'injection répétée de molécules chimiques ou biologiques. De plus, les constructions bloquant P2X7 ont permis d'inhiber les symptômes et le score clinique de la colite aiguë et chronique dans le modèle DSS tandis que les constructions 14D5-dimHLE potentialisatrices de P2X7 semblent aggraver ce score clinique. Ce travail nous a également permis de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser cette méthodologie dans d'autres modèles expérimentaux. Nous avons tenté de mettre en place le modèle de carcinogénèse *in situ* induite par l'inflammation du colon et par l'administration d'un carcinogène, l'azoxyméthane (AOM), avant le premier cycle de DSS afin de confirmer les résultats de l'étude de Hofman et collaborateurs. Dans cette étude, l'inactivation génétique ou l'inhibition pharmacologique de P2X7 était liée à la diminution de l'inflammation mais entraînait paradoxalement un plus grand nombre de tumeurs colorectales (Hofman et al. 2015). Cette étude mettait ainsi en avant pour la première fois l'hypothèse que la stimulation de P2X7 pouvait à l'inverse possiblement entraîner des effets antitumoraux.

Nous avons ainsi souhaité évaluer si la construction 14D5-dimHLE, potentialisatrice de P2X7, permettrait de stimuler un effet antitumoral. Cette expérience a été réalisée plusieurs fois sans obtenir de résultat interprétable et reproductible. En effet, dans la mise en place du modèle lui-même, on observait soit un trop grand nombre soit trop peu de tumeurs ce qui ne nous permettait pas de mettre en évidence de différence statistique dans le nombre de tumeurs après traitements dans les différents groupes. Nous avons notamment testé différentes doses d'AOM (7 mg/kg ou 8 mg/kg) et différents temps de cinétique pour l'analyse du nombre de tumeurs (J80, J86, J100). Une des expériences réalisées avec des sacrifices à des temps différents, dans le but d'optimiser le modèle et de définir le moment le mieux adapter à l'analyse de ce modèle, a néanmoins permis d'obtenir des résultats encourageants. On a pu observer en effet, avec la construction 14D5-dimHLE, une diminution du nombre de tumeurs. Cependant les données n'étaient pas interprétables sur le plan statistique dû au manque d'effectifs (N=3 par groupe) des animaux à sacrifier à ce temps précis de la cinétique (J80 post AOM). Ces résultats n'ont cependant pas pu être confirmés aux autres points de cette cinétique (J70 et J98 post-AOM). Par ailleurs, les contraintes de sécurité liées à l'utilisation d'un agent carcinogène (AOM) dans ces études, ne nous ont pas permis de poursuivre ces expériences pour des raisons liées aux contraintes de gestion de notre animalerie.

Il s'avère que l'implication de P2X7 dans la carcinogénèse est complexe. En effet, chez des souris déficientes pour P2X7, on observe un volume tumoral plus important, démontrant alors l'importance du rôle de P2X7 sur les cellules hématopoïétiques et notamment immunitaires, dans le contrôle tumoral (Adinolfi et al. 2015). Cependant, les cellules tumorales exprimant P2X7 montrent une accélération de la croissance tumorale, démontrant un avantage sélectif du récepteur P2X7 dans

la croissance et l'agressivité de la tumeur (Adinolfi et al. 2009). Afin de disséquer le rôle du récepteur P2X7 dans le contexte tumoral, nous avons par la suite utilisé la méthodologie AAVnano codant pour nos constructions antagonistes ou potentialisatrices de P2X7 dans des modèles expérimentaux de tumeurs exprimant P2X7 selon différents niveaux : un modèle de carcinome pulmonaire (LLC) exprimant très faiblement P2X7, un modèle de mélanome B16-F10 exprimant P2X7 et un modèle de thymome exprimant fortement P2X7 (EG7). En inoculant les cellules tumorales trois semaines après injection des AAV, nous avons démontré que le blocage de P2X7 permet de ralentir la croissance tumorale lorsque la tumeur exprime P2X7. Cependant, lorsque la tumeur ne l'exprime que faiblement, nous n'avons observé aucun effet significatif des AAVnano codant pour les constructions antagonistes ou potentialisatrices de P2X7. 14D5-dimHLE, potentialisateur de P2X7, n'a pas d'effet sur la croissance tumorale ou la survie des souris que la tumeur exprime ce récepteur ou non. Une des hypothèses évoquées est que la stimulation de P2X7 ne permet pas d'induire seule, une réponse antitumorale. La stimulation de P2X7 pourrait être déjà maximale. Compte tenu de la concentration élevée de l'ATP dans le microenvironnement tumoral, la modulation positive de P2X7 n'apporte pas d'avantage significatif. De plus, la tumeur peut exprimer un variant ou avoir des mutations perte de fonction qui vont provoquer la prolifération des cellules tumorales après activation de P2X7, et non l'ouverture du macropore entraînant la mort cellulaire de celles-ci. En effet, il est connu que les tumeurs expriment des variants d'épissage avec la queue C-terminale tronquée tels que le variant P2X7B. La modulation positive de P2X7 a alors un effet stimulant la croissance tumorale (directe ou indirecte) et un effet antitumoral sur la réponse immunitaire, on agirait alors sur la réactivation de la réponse immunitaire. L'effet net global de la stimulation positive de P2X7 serait alors l'absence d'effet. Une des façons de tester cette hypothèse serait d'utiliser une lignée tumorale n'exprimant pas P2X7 avec la construction 14D5-dimHLE comme la lignée EG7 très immunogène modifiée par CRISPR/Cas9 ou de séquencer le variant exprimé par la tumeur. Pour cela nous avons généré des lignées EG7 déficientes pour P2X7 par CRISPR/Cas9. Une autre hypothèse est que cette construction pourrait induire l'internalisation partielle de P2X7 même s'il conserve son action potentialisatrice sur les récepteurs toujours présents à la membrane. Ceci limiterait alors l'ampleur de la modulation positive. On observerait alors une diminution de l'activation de l'inflammasome sur les cellules myéloïdes ainsi qu'une diminution de la mort cellulaire des Tregs.

Nous avons ensuite analysé la composition de l'infiltrat tumoral par cytométrie en flux et démontré que les deux constructions modifiaient les proportions des cellules infiltrant le microenvironnement tumoral. La construction potentialisatrice 14D5-dimHLE induit un phénotype proinflammatoire avec l'augmentation de LT CD8⁺, de TAM de type M1 et la diminution des LT CD4⁺ conventionnels et régulateurs exprimant les ectonucléotidases CD39 et CD73 ainsi que la diminution

du marqueur TIGIT associé à l'immunorégulation sur les LT CD4⁺ conventionnels. La question de savoir s'il faut inhiber ou activer le récepteur P2X7 dans le contexte tumoral reste ainsi une question difficile à trancher. Inhiber P2X7 va d'une part empêcher la prolifération des cellules tumorales exprimant P2X7 mais également d'inhiber les réponses immunitaires antitumorales. A l'inverse, activer P2X7 peut augmenter l'effet cytotoxique lié à P2X7 sur les cellules tumorales même si ces dernières expriment souvent un variant incapable de former le macropore responsable de la mort cellulaire. Activer P2X7 peut également augmenter les réponses immunitaires antitumorales mais aussi stimuler les cellules immunosuppressives infiltrant le microenvironnement tumoral tels que les MDSCs et les TAM de types M2. Il a été démontré que la molécule HEI-3090, un modulateur chimique allostérique positif ayant une action possiblement comparable à 14D5-dimHLE, permet d'amplifier la voie ATP/P2X7/NLRP3/IL-18 dans les cellules dendritiques, sensibilise les tumeurs aux points de contrôle immunitaires anti-PD1 et permet des réponses immunitaires mémoires à long terme (Douguet et al. 2021). Cette étude montre ainsi très clairement, et pour la première fois, que la modulation positive de P2X7 peut avoir des effets majeurs sur la stimulation des réponses antitumorales.

Dans nos propres études, nous observons une certaine réactivation des réponses immunitaires antitumorales mesurables dans l'infiltrat tumoral mais qui semble insuffisante pour induire une régression tumorale. D'autre part, les résultats obtenus avec cette construction 14D5-dimHLE sont assez hétérogènes dans le modèle EG7. Cette hétérogénéité pouvait être notée à la fois au sein des individus dans ce groupe dans une même expérience, comme dans une expérience à l'autre. Ces résultats nous ont amené à faire l'hypothèse que dans notre modèle, la modulation positive de P2X7 au moyen de la construction 14D5-dimHLE ne permettait pas à elle seule d'induire un effet antitumoral reproductible et robuste. Nous avons ensuite décidé de stimuler ces réponses immunitaires en associant la méthodologie AAVnano à d'autres traitements immunostimulants. Tout d'abord, nous avons combiné ces AAVnano avec une chimiothérapie dérivée des cisplatines permettant d'induire une forme de mort cellulaire plus immunogénique que les chimiothérapies qui induisent l'apoptose. Suite à ce traitement, les cellules tumorales mourantes pourraient alors libérer de l'ATP qui agirait sur les récepteurs P2X7 des DC qui permettrait de stimuler l'inflammasome NLRP3 et la libération d'IL-1 β (Ghiringhelli et al. 2009). Nous avons démontré que l'oxaliplatine en combinaison avec notre construction 14D5-dimHLE permettait de ralentir la croissance tumorale et d'améliorer la survie des souris. La combinaison de la construction potentialisatrice 14D5-dimHLE avec l'oxaliplatine permettait également d'augmenter les réponses immunitaires spécifiques de l'antigène modèle Ova exprimé par la lignée tumorale EG7. Cette réponse a en effet pu être suivie par cytométrie en flux grâce à des dextramères (H2K^b-ova) qui permettent la détection des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène modèle Ovalbumine. La combinaison des deux traitements augmentait le pourcentage de cellules

positives pour le dextramère 13 jours et 22 jours après l'inoculation de la tumeur. Nous avons également observé une augmentation des réponses anticorps contre l'Ova dans le groupe traité par la combinaison de 14D5-dimHLE et oxaliplatine. Cependant, ces résultats n'étaient pas significatifs sur le plan statistique potentiellement à cause de trop faibles effectifs et de l'hétérogénéité de ces réponses immunitaires. Ces expériences devront ainsi être reproduites sur de plus grands effectifs avant de pouvoir conclure sur ces résultats qui restent à ce stade préliminaire.

Il a également été démontré que des molécules chimiques ou des anticorps bloquant l'ectonucléotidase CD39 pouvait également stimuler l'axe ATP/P2X7/NLRP3/IL-18 en empêchant la dégradation de l'ATP, ce qui permettrait son accumulation, et la stimulation conséquente des réponses immunitaires antitumorales (Li et al. 2019). Ces anti-CD39 stimulent l'activation des cellules myéloïdes et les fonctions effectrices des NK, inhibent la formation des métastases dans différents modèles expérimentaux de tumeurs (Yan et al. 2020). Une autre ectonucléotidase, CD73, permettant la formation d'adénosine anti-inflammatoire montre également un intérêt dans le cancer. En effet, son inhibition au moyen d'anticorps monoclonaux classiques est également à l'étude seul ou en combinaison avec des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans le cancer. Cibler cette enzyme permettrait de renforcer les réponses immunitaires antitumorales (Jin et al. 2010). En suivant la direction tracée par ces nouvelles données, nous avons ensuite tenté d'étendre notre méthodologie AAVnano anti-P2X7 (14D5-dimHLE) en combinaison avec d'autres AAVnano, ciblant PD-L1 (PD-L1-dimHLE), CD73 (CD73-dimHLE) ou les deux au travers d'une construction bispécifique CD73/PD-L1-HLE. Le but étant de stimuler, de la même façon qu'avec l'oxaliplatine, les réponses immunitaires antitumorales dans les deux modèles tumoraux EG7 et B16F10. La construction anti-PD-L1 devait servir de traitement de référence, tandis que celle ciblant CD73 devait permettre l'augmentation de l'ATP et la diminution de l'adénosine anti-inflammatoire dans l'environnement tumoral. La construction bispécifique quant à elle, devait permettre de cibler plus sélectivement le microenvironnement tumoral. En effet, CD73 et PD-L1 sont surexprimés dans cet environnement par les cellules tumorales et les cellules immunosuppressives. Cela devait donc permettre à cette construction bispécifique d'être dirigée plus sélectivement dans la tumeur et d'y exercer son action antagoniste sur les voies ciblées, celle de l'axe PD-1/PD-L1 et celle de l'activité enzymatique portée par CD73. Nous avons observé dans les deux modèles tumoraux une efficacité des constructions bispécifiques CD73/PD-L1-HLE sur la croissance tumorale et la survie des souris. La construction anti-PD-L1-dimHLE permet également un ralentissement de la croissance tumorale et une meilleure survie. Tandis que la construction CD73-dimHLE seule ne semble pas avoir d'effet sur le volume tumoral et la survie des souris. Bien qu'un effet soit observé sur la composition du microenvironnement tumoral et notamment sur les cellules immunosuppressives, il semblerait qu'il faille donc associer cet anti-CD73

avec une thérapie susceptible de stimuler les réponses effectrices antitumorales. Notre anti-CD73 en combinaison avec 14D5-dimHLE ne semble pas non plus impacter la croissance tumorale ou la survie des souris. Ce résultat est possiblement en lien avec l'inhibition qui reste que partielle, et non totale, de l'activité enzymatique de CD73 par le clone SB121 contenu dans cette construction. D'autres clones de nanobodies, plus efficaces dans leur pouvoir antagoniste, devront être testés à l'avenir.

Il a été montré dans plusieurs études que bloquer efficacement CD73 permettait de réveiller les réponses antitumorales en association avec des points de contrôle immunitaires et notamment en association avec un anti-PD-L1 (Allard et al. 2016; Allard et al. 2013). De la même manière, nous avons choisie d'associer l'anti-PD-L1 avec l'anti-CD73 pour former la construction bispécifique CD73/PD-L1-HLE et évaluer ces effets *in vivo* sur la croissance tumorale et la survie des souris. La construction anti-PD-L1 permet de réduire significativement le volume tumoral et d'augmenter la survie des animaux mais le bispécifique ciblant à la fois PD-L1 et CD73 montre une efficacité plus importante encore dans les deux modèles tumoraux utilisés. Ce résultat important est possiblement en lien avec un mode d'action double permettant au travers de l'anti-PD-L1 de stimuler l'immunité adaptative, et au travers de l'anti-CD73 de remodeler l'environnement immunosuppresseur de la tumeur en réduisant la fréquence des cellules myéloïdes immunosuppressives. Cette hypothèse de travail devrait être confirmée par des analyses plus exhaustives des cellules infiltrantes au cours du temps mais semble à ce stade très prometteuse.

Dans le modèle EG7 la combinaison de 14D5-dimHLE avec les constructions CD73/PD-L1-HLE et les constructions PD-L1-dimHLE renforce leur effet. A l'inverse, dans le modèle B16F10 la combinaison avec 14D5-dimHLE semble inhiber l'effet. Ceci peut s'expliquer par le variant de P2X7 exprimé par les cellules tumorales. En fonction du variant et de son niveau d'expression, l'effet peut être différent. Notamment le variant P2X7B chez l'homme ne permet pas d'ouvrir le macropore et donc de conduire à la mort cellulaire. Le variant nfP2X7, également fortement exprimé par les tumeurs humaines, ne possède pas la capacité de former le macropore mais conserve le canal ionique permettant la prolifération et la survie des cellules tumorales. Ceci peut être également dû à la différence de composition du microenvironnement tumoral. En effet, le microenvironnement tumoral agit différemment en fonction des cellules présentes, notamment des cellules immunosuppressives, qui peuvent proliférer pour certaines en présence d'ATP. De plus, la tumeur peut exprimer une forte quantité d'ectonucléotidases CD39 et CD73 et donc diminuer fortement la concentration d'ATP dans le milieu tumoral. Ainsi, il semble là aussi qu'une analyse plus poussée de la nature des variants de P2X7 exprimé par la tumeur, mais aussi de la composition précise des cellules du microenvironnement tumoral, et de l'expression par celle-ci des enzymes qui régulent la signalisation purinergique, est nécessaire pour mieux appréhender ces effets.

Limites du modèle

Pour étudier le rôle de P2X7 dans le cancer, nous avons eu recours à des greffes syngéniques ectopiques de cellules tumorales injectées en sous-cutanée sur le flanc de la souris. Ceci constituait une tumeur solide sous-cutanée qui ne représente alors pas le microenvironnement orthopique de la tumeur murine. Deux des avantages de cette greffe sont l'efficacité de la prise tumorale ainsi que la facilité à mesurer le volume tumoral sans avoir à sacrifier les animaux. L'injection du même nombre de cellules dans chaque animal nous permet de pouvoir comparer plus facilement l'effet des traitements entre les groupes. De plus, les cellules tumorales utilisées peuvent être génétiquement modifiées afin de surexprimer ou inactiver le récepteur cible par CRISPR/Cas9. Une des solutions pour s'affranchir de cette greffe ectopique est d'utiliser le modèle du cancer du sein 4T1 dans la souche murine Balb/c. Cette greffe peut se faire de manière orthopique au niveau d'un mamelon de l'animal et être facilement mesurée. Une des autres possibilités est l'induction chimique de tumeurs ou l'utilisation de modèles tumoraux spontanés. Cependant, l'emplacement et la prise tumorale ne sont pas contrôlables et reproductibles entre les animaux et rend difficile la comparaison entre les traitements.

Dans notre modèle nous n'avons pas analysé l'expression du variant de P2X7 par les lignées tumorales. Ceci pourrait expliquer les différences de résultats obtenus entre les lignées EG7 et B16F10 dans l'expérience de combinaison de 14D5-dimHLE avec les constructions anti-PD-L1-dimHLE et anti-CD73/PD-L1-HLE. En effet, la combinaison des deux traitements est efficace dans le modèle EG7 alors qu'elle semble augmenter la croissance tumorale dans le modèle B16F10. Ceci pourrait être la conséquence de l'expression d'un variant non fonctionnel dans le modèle B16F10 conduisant à la prolifération cellulaire plutôt qu'à la mort liée au macropore.

Si l'avantage majeur d'utiliser la méthodologie AAVnano est la nécessité d'injecter une seule fois les vecteurs rAAV afin d'avoir l'expression du transgène donc des constructions basées sur des nanobodies dans la circulation, une des limites de notre modèle est la cinétique d'expression du transgène. En effet, les AAV sont injectés trois semaines avant l'inoculation de la tumeur. Nous utilisons donc seulement un modèle prophylactique dû à l'expression lente du transgène elle-même liée à l'utilisation de rAAV simple brin. Il est alors nécessaire d'attendre deux à trois semaines avant d'atteindre une dose saturante de la protéine dans la circulation sanguine. Pour s'affranchir de cet inconvénient et tester l'effet de la modulation de P2X7 de manière thérapeutique, des scAAV doubles brins pourraient être utilisés. En effet, la suppression de l'étape de conversion sous forme bicaténaire accélère légèrement la cinétique d'expression du transgène. (McCarty, Monahan, and Samulski 2001).

Cependant ces scAAV sont plus inflammatoires car ils activent le système immunitaire inné par une voie dépendante du TLR9 et/ou Myd88 (Martino et al. 2011). Nous pouvons également utiliser les constructions recombinantes mais nous perdrons l'avantage d'utiliser les rAAV et la biodisponibilité qui en découle. Une des solutions pour s'affranchir de l'effet prophylactique est de décaler l'injection des vecteurs à une semaine avant l'inoculation de la tumeur ou une fois que celle-ci est établie. Cependant, nous ne contrôlerions pas la cinétique de production des transgènes et ils risqueraient de ne pas pouvoir arriver à saturation au moment de la prise tumorale. L'effet pourrait être hétérogène entre les individus d'un même groupe. Nous pourrions également utiliser un transgène avec une expression inductible afin d'avoir une expression de celui-ci au moment de la prise tumorale. Par exemple, TetOn permettrait d'induire l'expression des constructions à un moment précis par ajout de la tétracycline.

Une des particularités de l'utilisation des nanobodies est leur faible immunogénicité bien qu'ils proviennent d'une espèce différente, dû à leur forte homologie avec les séquences VH des anticorps murins et humains. Nous n'observons alors pas de réponses immunitaires détectables contre les nanobodies (Ackaert et al. 2021). Il a été démontré que la présence d'anticorps anti-nanobodies pouvait être détectée mais ces anticorps sont inefficaces (Holland et al. 2013). Les nanobodies ont donc un fort potentiel dans la thérapie antitumorale. La FDA a récemment autorisé la mise sur le marché du caplacizumab, un nanobody bivalent ciblant le facteur de von Willebrand produit par la société Ablynx, principale société de biotechnologie spécialisée dans les nanobodies. Une demande d'autorisation de mise sur le marché européen a été soumise pour le caplacizumab. Cette dernière a été validée en 2018 ce qui en fait le premier nanobody approuvé pour le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis (Wanner et al. 2021). La question se pose alors de l'immunogénicité des rAAV mais les réponses immunitaires dirigées contre les capsides des AAV sont faibles et inefficaces chez la souris, ce que l'on peut démontrer au vu de la persistance de nos nanobodies dans le sérum.

Modèle translationnel chez l'Homme

D'un point de vue thérapeutique, utiliser des antagonistes de P2X7 semble être une bonne alternative aux traitements actuels dans de nombreuses pathologies notamment inflammatoires. Des essais cliniques ont été conçus pour tester la sécurité, la tolérance et l'application clinique de plusieurs antagonistes de P2X7 tels que l'AZD9056, le CE-224,535 et le GSK1482160 pour le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires. AZD9056 est un inhibiteur du récepteur P2X7 capable d'avoir une fonction antagoniste sur l'effet positif du BzATP sur l'activation de P2X7 (Zhang et al. 2021). L'innocuité et l'efficacité de l'inhibiteur ont été évaluées dans différents essais cliniques de phase I et

Il pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (NCT00908934, NCT00700986 et NCT00520572). Tandis qu'un autre essai clinique de phase I, mené sur une cohorte de personnes saines, a évalué sa pharmacocinétique en association avec la simvastatine (NCT007366069), un composé utilisé pour réduire les taux de cholestérol/lipides. L'inhibiteur CE-224,535 a été évalué à plusieurs reprises pour le traitement de maladies auto-immunes, dont la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose, dans plusieurs essais cliniques de phase I, II et III (NCT00418782, NCT00782600, NCT00446784, NCT00838058, et NCT00628095). En particulier, l'efficacité et l'innocuité du CE-224,535 ont été évaluées sans succès dans un essai clinique de phase II (NCT00628095) pour le traitement de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ne répondant pas au méthotrexate, qui est utilisé pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes (Stock et al. 2012). Bien qu'il ait été émis l'hypothèse d'un possible effet anti-inflammatoire du CE-224,535 *via* l'inhibition de P2X7 et la réduction consécutive de l'IL-1 β et de l'IL-18, la présence de multiples voies impliquées dans la libération de cytokines pro-inflammatoires supplémentaires pourrait maintenir une l'inflammation chronique affectant ces patients. En ce qui concerne le GSK1482160, un essai clinique de phase I a été réalisé pour tester son efficacité et sa tolérance dans le traitement des douleurs inflammatoires (NCT00849134). L'utilisation du GSK1482160 comme agent thérapeutique potentiel pour le traitement du cancer a également été envisagée (Drill et al. 2021). Les pathologies pour lesquelles le blocage de P2X7 semble être prometteur sont les maladies neuropsychiatriques telles que la dépression, avec un essai clinique de phase II en cours. Cependant chez l'homme, P2X7 possède de nombreux variants d'épissage et de nombreuses mutations ponctuelles, ce qui en fait un gène ayant différentes activités. En effet, certains variants ou mutations présentent une activité réduite de P2X7 ou au contraire une augmentation de son activité.

Dans le contexte tumoral, en raison de variants d'épissage du gène *P2RX7* exprimés par l'homme et les mutations du récepteur P2X7 exprimés par la tumeur, son rôle semble complexe. En effet, il a été montré que le récepteur P2X7 était surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines, ce qui leur confèreraient un avantage sélectif. De plus, le variant nfP2X7, pour lequel la stimulation n'est pas associée à l'ouverture du macropore, complique la compréhension du rôle du récepteur P2X7 dans le cancer. Il a été émis l'hypothèse que les hautes concentrations d'ATP du TME sont responsables de la forte expression de nfP2X7 dans les cellules cancéreuses (Gilbert et al. 2019). En effet, des expériences avec des lignées cellulaires de myélome ont montré que l'incubation avec de l'ATP à une concentration comprise entre 0,1 et 0,25 mM pendant une nuit entraîne une diminution progressive de la formation des macropores qui est complètement abolie à une concentration de 0,5 mM. Ces résultats indiquent que les cellules sont capables de s'adapter aux concentrations élevées d'ATP retrouvées dans le TME. L'incubation avec l'ATP favorise une dérégulation rapide de P2X7 suivie d'une apparition lente de nfP2X7 à la surface cellulaire. De cette manière, les cellules bénéficient de la

stimulation de nfp2X7 sans que la mort cellulaire ne soit provoquée par l'ouverture du macropore. Cependant, le variant d'épissage codant pour la forme non fonctionnelle du récepteur n'est pas encore connu, mais des essais cliniques de phase I sont en cours pour tester la sécurité et la tolérance des anticorps capables de reconnaître ces variants d'épissage spécifiques pour le traitement du carcinome basocellulaire (NCT02587819). Bloquer P2X7 semble donc être une piste dans le cas où la tumeur exprime un récepteur P2X7 lui conférant un avantage sélectif en termes de prolifération, de dissémination et de métastases. Cependant, aucun essai clinique n'a été entrepris pour tester l'utilisation d'antagonistes pour le traitement des cancers. En effet, l'activation de P2X7 induit une réponse antitumorale par les cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur et donc l'utilisation d'antagonistes semblerait favoriser la progression de la tumeur. Cependant, les données rapportées par les études précliniques sont prometteuses et des tests supplémentaires pourraient donc être menés pour valider l'utilisation des antagonistes dans le traitement du cancer. L'effet antitumoral des antagonistes de P2X7 a également été signalé comme étant plus important chez les souris immunocompétentes que chez les souris immunodéficientes. Cela pourrait également être dû au blocage des récepteurs exprimés dans les MDSCs dans lesquelles l'activation du récepteur induit la libération de facteurs immunosuppresseurs (Amoroso et al, 2015).

D'un autre point de vue, utiliser un modulateur allostérique positif semble être une bonne stratégie dans le traitement des cancers. En effet, il pourrait notamment augmenter les réponses immunitaires comme il a été montré avec le modulateur allostérique positif HEI3090 en combinaison avec des points de contrôle immunitaires tels que l'anti-PD1. Dans cette étude, l'activation de P2X7 sur les DC exprimant l'inflammasome permet la sécrétion d'IL-18 activant les NK et les LT CD4⁺. Ces derniers vont à leur tour libérer de l'IFN- γ stimulant alors les réponses immunitaires antitumorales ce qui permet l'installation d'une réponse immunitaire antitumorale mémoire (Douguet et al. 2021).

Bien entendu les vecteurs rAAV ne peuvent pas être utilisés en clinique pour moduler l'action du récepteur P2X7. Dans cette étude l'utilisation des AAV nous permettait de faciliter l'injection et l'étude de la modulation de P2X7 de façon chronique. Chez l'homme, l'injection de nanobodies ou de constructions basées sur des nanobodies recombinants ou de molécules chimiques seraient en effet plus envisageables afin de moduler P2X7 à court terme. Il serait possible notamment d'inhiber P2X7 dans les pathologies inflammatoires et le cancer ou encore de le potentialiser en fonction du variant exprimé par la tumeur. Et ceci, en combinaison avec des chimiothérapies immunogéniques ou des anticorps bloquant des points de contrôle immunitaires. De plus, nous ne pourrions pas utiliser 13A7-Fc et 14D5-dimHLE en tant que constructions basées sur des nanobodies thérapeutiques chez l'homme, ceux-ci ciblant uniquement le récepteur murin. Une des constructions antagonistes de P2X7 testé, 1C81, est capable de bloquer efficacement les récepteurs P2X7 murins et humains, il pourrait

donc être utilisé chez l'homme dans le cadre de maladies inflammatoires ou de cancers. L'utilisation de construction basées sur des nanobodies anti-CD73 et anti-PD-L1 ou d'une bispécifique anti-CD73/PD-L1 pourrait également être une alternative dans le traitement des cancers. En effet, cibler ces deux voies de façon synergique pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des réponses antitumorales. La construction bispécifique pourrait également réduire les effets secondaires liés aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires. En effet, en ciblant deux protéines surexprimées dans le TME, cela pourrait permettre de redistribuer spécifiquement les nanobodies bispécifiques au sein de la tumeur elle-même.

Bibliographie

- ABBACCHIO, MARIA P., GEOFFREY BURNSTOCK, JEAN-MARIE BOEYNAEMS, ERIC A. BARNARD, JOSÉ L. BOYER, CHARLES KENNEDY, GILLIAN E. KNIGHT, et al. 2006. "International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy." *Pharmacological Reviews* 58 (3): 281. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.3>.
- Abiko, K., N. Matsumura, J. Hamanishi, N. Horikawa, R. Murakami, K. Yamaguchi, Y. Yoshioka, T. Baba, I. Konishi, and M. Mandai. 2015. "IFN- γ from Lymphocytes Induces PD-L1 Expression and Promotes Progression of Ovarian Cancer." *British Journal of Cancer* 112 (9): 1501. <https://doi.org/10.1038/BJC.2015.101>.
- Ackaert, Chloé, Natalia Smiejewska, Catarina Xavier, Yann G.J. Sterckx, Sofie Denies, Benoit Stijlemans, Yvon Elkrim, et al. 2021. "Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies." *Frontiers in Immunology* 12 (March). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.632687/FULL>.
- Adamczyk, Magdalena, Rhiannon Griffiths, Sharon Dewitt, Vera Knäuper, and Daniel Aeschlimann. 2015. "P2X7 Receptor Activation Regulates Rapid Unconventional Export of Transglutaminase-2." *Journal of Cell Science* 128 (24): 4615. <https://doi.org/10.1242/JCS.175968>.
- Adamson, Samantha E., and Norbert Leitinger. 2014. "The Role of Pannexin1 in the Induction and Resolution of Inflammation." *FEBS Letters* 588 (8): 1416. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.03.009>.
- Adinolfi, Elena, Maria Giulia Callegari, Maria Cirillo, Paolo Pinton, Carlotta Giorgio, Dario Cavagna, Rosario Rizzuto, and Francesco Di Virgilio. 2009. "Expression of the P2X7 Receptor Increases the Ca²⁺ Content of the Endoplasmic Reticulum, Activates NFATc1, and Protects from Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 284 (15): 10120–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805805200>.
- Adinolfi, Elena, Maria Giulia Callegari, Davide Ferrari, Chiara Bolognesi, Mattia Minelli, Mariusz R. Wieckowski, Paolo Pinton, Rosario Rizzuto, and Francesco Di Virgilio. 2005. "Basal Activation of the P2X7 ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-Independent Growth." *Molecular Biology of the Cell* 16 (7): 3260–72. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-1025>.
- Adinolfi, Elena, Marina Capece, Alessia Franceschini, Simonetta Falzoni, Anna L. Giuliani, Alessandra Rotondo, Alba C. Sarti, et al. 2015. "Accelerated Tumor Progression in Mice Lacking the ATP Receptor P2X7." *Cancer Research* 75 (4): 635–44. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1259>.
- Adinolfi, Elena, Maria Cirillo, Ronja Woltersdorf, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Patrizia Pellegatti, Maria Giulia Callegari, Dorian Sardonà, Fritz Markwardt, Günther Schmalzing, and Francesco Di Virgilio. 2010. "Trophic Activity of a Naturally Occurring Truncated Isoform of the P2X7 Receptor." *The FASEB Journal* 24 (9): 3393–3404. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-153601>.
- . 2010. "Trophic Activity of a Naturally Occurring Truncated Isoform of the P2X7 Receptor." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (9): 3393–3404. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-153601>.
- Adinolfi, Elena, Anna Lisa Giuliani, Elena De Marchi, Anna Pegoraro, Elisa Orioli, and Francesco Di Virgilio. 2018. "The P2X7 Receptor: A Main Player in Inflammation." *Biochemical Pharmacology* 151: 234–44. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.021>.
- Adinolfi, Elena, Elena De Marchi, Elisa Orioli, Anna Pegoraro, and Francesco Di Virgilio. 2019. "Role of the P2X7 Receptor in Tumor-Associated Inflammation." *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.012>.
- Adinolfi, Elena, Loredana Melchiorri, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Anna Morelli, Alessia Tieghi, Antonio Cuneo, Gianluigi Castoldi, Francesco Di Virgilio, and Olavio R. Baricordi. 2002. "P2X7 Receptor Expression in Evolutive and Indolent Forms of Chronic B Lymphocytic Leukemia." *Blood* 99 (2): 706–8. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.2.706>.
- Adinolfi, Elena, Lizzia Raffaghello, Anna Lisa Giuliani, Luigi Cavazzini, Marina Capece, Paola Chiozzi, Giovanna Bianchi, Guido Kroemer, Vito Pistoia, and Francesco Di Virgilio. 2012. "Expression of P2X7 Receptor Increases in Vivo Tumor Growth." *Cancer Research* 72 (12): 2957–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1947>.
- Adriouch, S, W Ohlrogge, F Haag, F Koch-Nolte, and M Seman. 2001. "Rapid Induction of Naive T Cell Apoptosis by Ecto-Nicotinamide Adenine Dinucleotide: Requirement for Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 2 and a Downstream Effector." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (1): 196–203. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.1.196>.
- Adriouch, Sahil, Peter Bannas, Nicole Schwarz, Ralf Fliegert, Andreas H. Guse, Michel Seman, Friedrich Haag,

- Friedrich Koch-Noke, and Friedrich Koch-Noke. 2008. "ADP-ribosylation at R125 Gates the P2X7 Ion Channel by Presenting a Covalent Ligand to Its Nucleotide Binding Site." *The FASEB Journal* 22 (3): 861–69. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9294com>.
- Adriouch, Sahil, C Dox, V Welge, Michel Seman, Friedrich Koch-Nolte, and Friedrich Haag. 2002. "Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (8): 4108–12. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.8.4108>.
- Adriouch, Sahil, Sandra Hubert, Severine Pechberty, Friedrich Koch-Nolte, Friedrich Haag, and Michel Seman. 2007. "NAD⁺ Released during Inflammation Participates in T Cell Homeostasis by Inducing ART2-Mediated Death of Naive T Cells in Vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (1): 186–94. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.1.186>.
- Aglietti, Robin A., and Erin C. Dueber. 2017. "Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions." *Trends in Immunology* 38 (4): 261–71. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2017.01.003>.
- Ahmazadeh, Mojgan, Laura A. Johnson, Bianca Heemskerk, John R. Wunderlich, Mark E. Dudley, Donald E. White, and Steven A. Rosenberg. 2009. "Tumor Antigen-Specific CD8 T Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of PD-1 and Are Functionally Impaired." *Blood* 114 (8): 1537. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-12-195792>.
- Airas, Laura, Jussi Niemelä, Marko Salmi, Tarja Puurunen, David J. Smith, and Sirpa Jalkanen. 1997. "Differential Regulation and Function of CD73, a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked 70-KD Adhesion Molecule, on Lymphocytes and Endothelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 136 (2): 421–31. <https://doi.org/10.1083/JCB.136.2.421>.
- Alberto, A. V.P., R. X. Faria, C. G.C. Couto, L. G.B. Ferreira, C. A.M. Souza, P. C.N. Teixeira, M. M. Fróes, and L. A. Alves. 2013. "Is Pannexin the Pore Associated with the P2X7 Receptor?" *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2013 386:9 386 (9): 775–87. <https://doi.org/10.1007/S00210-013-0868-X>.
- Allard, Bertrand, Paul A. Beavis, Phillip K. Darcy, and John Stagg. 2016. "Immunosuppressive Activities of Adenosine in Cancer." *Current Opinion in Pharmacology* 29 (May): 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2016.04.001>.
- Allard, Bertrand, Maria Serena Longhi, Simon C. Robson, and John Stagg. 2017a. "The Ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel Checkpoint Inhibitor Targets" 276 (1): 121–44. <https://doi.org/10.1111/IMR.12528>.
- . 2017b. "The Ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel Checkpoint Inhibitor Targets." *Immunological Reviews* 276 (1): 121–44. <https://doi.org/10.1111/IMR.12528>.
- Allard, Bertrand, Sandra Pommey, Mark J. Smyth, and John Stagg. 2013. "Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 MABs." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (20): 5626–35. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0545>.
- Allard, Bertrand, Martin Turcotte, Kathleen Spring, Sandra Pommey, Isabelle Royal, and John Stagg. 2014. "Anti-CD73 Therapy Impairs Tumor Angiogenesis." *International Journal of Cancer* 134 (6): 1466–73. <https://doi.org/10.1002/IJC.28456>.
- Allard, David, Bertrand Allard, Pierre Olivier Gaudreau, Pavel Chrobak, and John Stagg. 2016. "CD73-Adenosine: A next-Generation Target in Immuno-Oncology." *Immunotherapy* 8 (2): 145–63. <https://doi.org/10.2217/IMT.15.106>.
- Allen, IC, MA Scull, CB Moore, EK Holl, E McElvania-TeKippe, DJ Taxman, EH Guthrie, RJ Pickles, and JP Ting. 2009. "The NLRP3 Inflammasome Mediates in Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA." *Immunity* 30 (4): 556–65. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2009.02.005>.
- Allsopp, Rebecca C., and Richard J. Evans. 2015. "Contribution of the Juxtatransmembrane Intracellular Regions to the Time Course and Permeation of ATP-Gated P2X7 Receptor Ion Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (23): 14556. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.642033>.
- Altintas, Isil, Raimond Heukers, Roy Van Der Meel, Marie Lacombe, Maryam Amidi, Paul M.P. Van Bergen En Henegouwen, Wim E. Hennink, Raymond M. Schiffelers, and Robbert J. Kok. 2013. "Nanobody-Albumin Nanoparticles (NANAPs) for the Delivery of a Multikinase Inhibitor 17864 to EGFR Overexpressing Tumor Cells." *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 165 (2): 110–18. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.11.007>.
- Alves, Luiz Anastacio, Rômulo José Soares Bezerra, Robson Xavier Faria, Leonardo Gomes Braga Ferreira, and Valber Da Silva Frutuoso. 2013. "Physiological Roles and Potential Therapeutic Applications of the P2X7 Receptor in Inflammation and Pain." *Molecules* 2013, Vol. 18, Pages 10953-10972 18 (9): 10953–72.

- <https://doi.org/10.3390/MOLECULES180910953>.
- Alzola, E, A Pérez-Etxebarria, E Kabré, DJ Fogarty, M Métioui, N Chaïb, JM Macarulla, C Matute, JP Dehaye, and A Marino. 1998. "Activation by P2X7 Agonists of Two Phospholipases A2 (PLA2) in Ductal Cells of Rat Submandibular Gland. Coupling of the Calcium-Independent PLA2 with Kallikrein Secretion." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30208–17. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.46.30208>.
- Amoroso, F., M. Capece, A. Rotondo, D. Cangelosi, M. Ferracin, A. Franceschini, L. Raffaghello, V. Pistoia, L. Varesio, and E. Adinolfi. 2015. "The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of the PI3K/GSK3 β /VEGF Signaling Network: Evidence in Experimental Neuroblastoma." *Oncogene* 34 (41): 5240–51. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.444>.
- Amoroso, F., S. Falzoni, E. Adinolfi, D. Ferrari, and F. Di Virgilio. 2012. "The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of Aerobic Glycolysis." *Cell Death & Disease* 2012 3:8 3 (8): e370–e370. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2012.105>.
- Amoroso, Francesca, Erica Salaro, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Anna Lisa Giuliani, Giorgio Cavallero, Pio Maniscalco, et al. 2016. "P2X7 Targeting Inhibits Growth of Human Mesothelioma." *Oncotarget* 7 (31): 49664–76. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.10430>.
- Amstrup, Jan, and Ivana Novak. 2003a. "P2X7 Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases ERK1 and ERK2 Independently of Ca²⁺ Influx." *Biochemical Journal* 374 (Pt 1): 51. <https://doi.org/10.1042/BJ20030585>.
- . 2003b. "P2X7 Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases ERK1 and ERK2 Independently of Ca²⁺ Influx." *Biochemical Journal* 374 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1042/BJ20030585>.
- Anselimi, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessaris N, et al. 2008. "ATP Release through Connexin Hemichannels and Gap Junction Transfer of Second Messengers Propagate Ca²⁺ Signals across the Inner Ear." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48): 18770–75. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0800793105>.
- Apolloni, Savina, Paola Fabbri, Susanna Amadio, Giulia Napoli, Mattia Freschi, Francesca Sironi, Paolo Pevarello, et al. 2021. "Novel P2X7 Antagonist Ameliorates the Early Phase of ALS Disease and Decreases Inflammation and Autophagy in SOD1-G93A Mouse Model." *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 10649 22 (19): 10649. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910649>.
- Aprile-Garcia, Fernando, Michael W. Metzger, Marcelo Paez-Pereda, Herbert Stadler, Matías Acuña, Ana C. Liberman, Sergio A. Senin, et al. 2016. "Co-Expression of Wild-Type P2X7R with Gln460Arg Variant Alters Receptor Function." *PLOS ONE* 11 (3): e0151862. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0151862>.
- Arulkumaran, Nishkantha, Robert J. Unwin, and Frederick W.K. Tam. 2011a. "A Potential Therapeutic Role for P2X7 Receptor (P2X7R) Antagonists in the Treatment of Inflammatory Diseases." *Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insertbiblio.Inist.Fr/10.1517/13543784.2011.578068* 20 (7): 897–915. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.578068>.
- . 2011b. "A Potential Therapeutic Role for P2X7 Receptor (P2X7R) Antagonists in the Treatment of Inflammatory Diseases." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 20 (7): 897–915. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.578068>.
- As-, Humoral, Hypersensitive States, S Raffel, Delayed Hypersensitivity, R E Billingham, and M Grodsky. 1965. "Adenovirus-Associated Virus" 149.
- Aswad, Fred, Hiroki Kawamura, and Gunther Dennert. 2005. "High Sensitivity of CD4+CD25+ Regulatory T Cells to Extracellular Metabolites Nicotinamide Adenine Dinucleotide and ATP: A Role for P2X7 Receptors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (5): 3075–83. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.5.3075>.
- Atarashi, Koji, Junichi Nishimura, Tatsuhiro Shima, Yoshinori Umesaki, Masahiro Yamamoto, Masaharu Onoue, Hideo Yagita, et al. 2008. "ATP Drives Lamina Propria T(H)17 Cell Differentiation." *Nature* 455 (7214): 808–12. <https://doi.org/10.1038/NATURE07240>.
- Auger, Rodolphe, Iris Motta, Karim Benihoud, David M. Ojcius, and Jean M. Kanellopoulos. 2005. "A Role for Mitogen-Activated Protein Kinase Erk1/2 Activation and Non-Selective Pore Formation in P2X7 Receptor-Mediated Thymocyte Death." *Journal of Biological Chemistry* 280 (30): 28142–51. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501290200>.
- Aymeric, Laetitia, Lionel Apetoh, François Ghiringhelli, Antoine Tesnière, Isabelle Martins, Guido Kroemer, Mark J Smyth, and Laurence Zitvogel. 2010. "Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity Setting the Stage." <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3566>.
- Azuma, Takeshi, Sheng Yao, Gefeng Zhu, Andrew S. Flies, Sarah J. Flies, and Lieping Chen. 2008. "B7-H1 Is a

- Ubiquitous Antiapoptotic Receptor on Cancer Cells." *Blood* 111 (7): 3635–43.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-11-123141>.
- Backlund, Lena, Catharina Lavebratt, Louise Frisén, Pernilla Nikamo, Dzana Hukic Sudic, Lil Träskman-Bendz, Mikael Landén, et al. 2012. "P2RX7: Expression Responds to Sleep Deprivation and Associates with Rapid Cycling in Bipolar Disorder Type 1." *PLoS ONE* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0043057>.
- Balazs, Alejandro B., Yong Ouyang, Christin M. Hong, Joyce Chen, Steven M. Nguyen, Dinesh S. Rao, Dong Sung An, and David Baltimore. 2014. "Vectored Immunoprophylaxis Protects Humanized Mice from Mucosal HIV Transmission." *Nature Medicine* 20 (3): 296–300. <https://doi.org/10.1038/nm.3471>.
- Banchereau, Jacques, and Ralph M. Steinman. 1998. "Dendritic Cells and the Control of Immunity." *Nature* 392:6673 392 (6673): 245–52. <https://doi.org/10.1038/32588>.
- Bannas, Peter, Sahil Adriouch, Sarah Kahl, Fenja Braasch, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2005. "Activity and Specificity of Toxin-Related Mouse T Cell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 Depends on Its Association with Lipid Rafts." *Blood* 105 (9): 3663–70. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-08-3325>.
- Bannas, Peter, Julia Hambach, and Friedrich Koch-Nolte. 2017. "Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics." *Frontiers in Immunology* 8 (November): 1603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>.
- Banz, Yara, Guido Beldi, Yan Wu, Ben Atkinson, Anny Usheva, and Simon C. Robson. 2008. "CD39 Is Incorporated into Plasma Microparticles Where It Maintains Functional Properties and Impacts Endothelial Activation." *British Journal of Haematology* 142 (4). <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2008.07230.X>.
- Barden, J. A., R. Sluyter, B. J. Gu, and J. S. Wiley. 2003. "Specific Detection of Non-Functional Human P2X(7) Receptors in HEK293 Cells and B-Lymphocytes." *FEBS Letters* 538 (1–3): 159–62. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00172-8).
- Baricordi, O. Roberte, Loredana Melchiorri, Elena Adinolfi, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Gary Buell, and Francesco Di Virgilio. 1999. "Increased Proliferation Rate of Lymphoid Cells Transfected with the P2X7 ATP Receptor *." *Journal of Biological Chemistry* 274 (47): 33206–8. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.47.33206>.
- Bartlett, Rachael, Leanne Stokes, and Ronald Sluyter. 2014. "The P2x7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2x7 Antagonists in Models of Disease." *Pharmacological Reviews* 66 (3): 638–75. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>.
- Basso, Ana M., Natalie A. Bratcher, Richard R. Harris, Michael F. Jarvis, Michael W. Decker, and Lynne E. Rueter. 2009. "Behavioral Profile of P2X7 Receptor Knockout Mice in Animal Models of Depression and Anxiety: Relevance for Neuropsychiatric Disorders." *Behavioural Brain Research* 198 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2008.10.018>.
- Bastid, J., A. Cottalorda-Regairaz, G. Alberici, N. Bonnefoy, J. F. Eliaou, and A. Bensussan. 2013. "ENTPD1/CD39 Is a Promising Therapeutic Target in Oncology." *Oncogene* 32 (14): 1743–51. <https://doi.org/10.1038/ONC.2012.269>.
- Beamer, Edward, Wolfgang Fischer, and Tobias Engel. 2017. "The ATP-Gated P2X7 Receptor as a Target for the Treatment of Drug-Resistant Epilepsy." *Frontiers in Neuroscience* 11 (FEB): 21. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2017.00021/BIBTEX>.
- Beavis, Paul A., John Stagg, Phillip K. Darcy, and Mark J. Smyth. 2012. "CD73: A Potent Suppressor of Antitumor Immune Responses." *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>.
- Becker, D, R Woltersdorf, W Boldt, S Schmitz, U Braam, G Schmalzing, and F Markwardt. 2008. "The P2X7 Carboxyl Tail Is a Regulatory Module of P2X7 Receptor Channel Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (37): 25725–34. <https://doi.org/10.1074/JBC.M803855200>.
- Bellucci, Roberto, Allison Martin, Davide Bommarito, Kathy Wang, Steen H. Hansen, Gordon J. Freeman, and Jerome Ritz. 2015. "Interferon-γ-Induced Activation of JAK1 and JAK2 Suppresses Tumor Cell Susceptibility to NK Cells through Upregulation of PD-L1 Expression." *Oncoimmunology* 4 (6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008824>.
- Benzaquen, Jonathan, Serena Janho Dit Hreich, Simon Heeke, Thierry Juhel, Salomé Lavee, Serge Bauwens, Simona Sacconi, et al. 2020. "P2RX7B Is a New Theranostic Marker for Lung Adenocarcinoma Patients." *Theranostics* 10 (24): 10849–60. <https://doi.org/10.7150/THNO.48229>.
- Benzaquen, Jonathan, Simon Heeke, Séréna Janho dit Hreich, Laetitia Douguet, Charles Hugo Marquette, Paul Hofman, and Valérie Vouret-Craviari. 2019. "Alternative Splicing of P2RX7 Pre-Messenger RNA in Health and Diseases: Myth or Reality?" *Biomedical Journal* 42 (3): 141–54.

- <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.05.007>.
- Bernier, Louis Philippe, Ariel R. Ase, and Philippe Séguéla. 2013. "Post-Translational Regulation of P2X Receptor Channels: Modulation by Phospholipids." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (NOV): 226. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00226/BIBTEX>.
- Beyer, E. C., and T. H. Steinberg. 1991. "Evidence That the Gap Junction Protein Connexin-43 Is the ATP-Induced Pore of Mouse Macrophages." *Journal of Biological Chemistry* 266 (13): 7971–74. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92924-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92924-8).
- Bhattacharya, Anindya, Brian Lord, Jan Sebastian Grigoleit, Yingbo He, Ian Fraser, Shannon N. Campbell, Natalie Taylor, et al. 2018. "Neuropsychopharmacology of JNJ-55308942: Evaluation of a Clinical Candidate Targeting P2X7 Ion Channels in Animal Models of Neuroinflammation and Anhedonia." *Neuropsychopharmacology* 2018 43:13 43 (13): 2586–96. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0141-6>.
- Bian, Shu, Xiaofeng Sun, Aiping Bai, Chunqing Zhang, Linglin Li, Keiichi Enjyoji, Wolfgang G. Junger, Simon C. Robson, and Yan Wu. 2013. "P2X7 Integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-MTOR Signaling Pathways to Mediate Tumor Cell Death." *PLOS ONE* 8 (4): e60184. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060184>.
- Bianchi, G., M. Vuerich, P. Pellegatti, D. Marimpietri, L. Emionite, I. Marigo, V. Bronte, F. Di Virgilio, V. Pistoia, and L. Raffaghello. 2014. "ATP/P2X7 Axis Modulates Myeloid-Derived Suppressor Cell Functions in Neuroblastoma Microenvironment." *Cell Death and Disease* 5 (3): e1135-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.109>.
- Bidula, Stefan, Kshitija Dhuna, Ray Helliwell, and Leanne Stokes. 2019. "Positive Allosteric Modulation of P2X7 Promotes Apoptotic Cell Death over Lytic Cell Death Responses in Macrophages." *Cell Death and Disease* 10 (12): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2110-3>.
- Bidula, Stefan M., Brett A. Cromer, Samuel Walpole, Jesus Angulo, and Leanne Stokes. 2019. "Mapping a Novel Positive Allosteric Modulator Binding Site in the Central Vestibule Region of Human P2X7." *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-39771-5>.
- Blasetti Fantauzzi, Claudia, Stefano Menini, Carla Iacobini, Chiara Rossi, Eleonora Santini, Anna Solini, and Giuseppe Pugliese. 2017. "Deficiency of the Purinergic Receptor 2X7 Attenuates Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by High-Fat Diet: Possible Role of the NLRP3 Inflammasome." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8962458>.
- Boison, Detlev, and Gennady G. Yegutkin. 2019. *Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. Cancer Cell*. Vol. 36. Cell Press.
- Bono, María Rosa, Dominique Fernández, Felipe Flores-Santibáñez, Mario Roseblatt, and Daniela Sauma. 2015. *CD73 and CD39 Ectonucleotidases in T Cell Differentiation: Beyond Immunosuppression. FEBS Letters*. Vol. 589. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>.
- Borea, Pier Andrea, Stefania Gessi, Stefania Merighi, Fabrizio Vincenzi, and Katia Varani. 2018. "Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art." *Physiol Rev* 98 (3): 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017.-Adenosine>.
- Borges da Silva, Henrique, Lalit K. Beura, Haiguang Wang, Eric A. Hanse, Reshma Gore, Milcah C. Scott, Daniel A. Walsh, et al. 2018. "The Purinergic Receptor P2RX7 Directs Metabolic Fitness of Long-Lived Memory CD8+ T Cells." *Nature* 559 (7713): 264–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0282-0>.
- Borges da Silva, Henrique, Changwei Peng, Haiguang Wang, Kelsey M. Wanhainen, Chaoyu Ma, Sharon Lopez, Alexander Khoruts, Nu Zhang, and Stephen C. Jameson. 2020. "Sensing of ATP via the Purinergic Receptor P2RX7 Promotes CD8+ Trm Cell Generation by Enhancing Their Sensitivity to the Cytokine TGF-β." *Immunity* 53 (1): 158. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476132030265X>.
- Borsellino, G, M Kleinewietfeld, D Di Mitri, A Sternjak, A Diamantini, R Giometto, S Höpner, et al. 2007. "Expression of Ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg Cells: Hydrolysis of Extracellular ATP and Immune Suppression." *Blood* 110 (4): 1225–32. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-12-064527>.
- Bour-Jordan, Hélène, Jonathan H. Esensten, Marc Martinez-Llordella, Cristina Penaranda, Melanie Stumpf, and Jeffrey A. Bluestone. 2011. "Intrinsic and Extrinsic Control of Peripheral T-Cell Tolerance by Costimulatory Molecules of the CD28/B7 Family." *Immunological Reviews* 241 (1): 180. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2011.01011.X>.
- Boussemaert, Lise, Isabelle Girault, Hélène Malka-Mahieu, Christine Mateus, Emilie Routier, Margot Rubington, Nyam Kamsu-Kom, et al. 2016. "Secondary Tumors Arising in Patients Undergoing BRAF Inhibitor Therapy Exhibit Increased BRAF-CRAF Heterodimerization." *Cancer Research* 76 (6): 1476–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2900-T>.
- Bowser, Jessica L., Michael R. Blackburn, Gregory L. Shipley, Jose G. Molina, Kenneth Dunner, and Russell R.

- Broaddus. 2016. "Loss of CD73-Mediated Actin Polymerization Promotes Endometrial Tumor Progression." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (1): 220–38. <https://doi.org/10.1172/JCI79380>.
- Boyd-Tressler, Andrea, Silvia Penuela, Dale W. Laird, and George R. Dubyak. 2014. "Chemotherapeutic Drugs Induce ATP Release via Caspase-Gated Pannexin-1 Channels and a Caspase/Pannexin-1-Independent Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (39): 27246. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.590240>.
- Bratton, DL, VA Fadok, DA Richter, JM Kailey, LA Guthrie, and PM Henson. 1997. "Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-Mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26159–65. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.42.26159>.
- Brisson, Lucie, Stéphanie Chadet, Osbaldo Lopez-Charcas, Bilel Jelassi, David Ternant, Julie Chamouton, Stéphanie Lerondel, et al. 2020. "P2X7 Receptor Promotes Mouse Mammary Cancer Cell Invasiveness and Tumour Progression, and Is a Target for Anticancer Treatment." *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2342 12 (9): 2342. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12092342>.
- Brisson, Lucie, Osbaldo Lopez-charcas, Bilel Jelassi, David Ternant, Fabrice Trovero, and Pierre Besson. 2020. "Cell Invasiveness and Tumour Progression , and Is a Target for Anticancer Treatment," 1–23.
- Broz, Petr, Pablo Pelegrín, and Feng Shao. 2019. "The Gasdermins, a Protein Family Executing Cell Death and Inflammation." *Nature Reviews Immunology*, November. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0228-2>.
- Brunet, Jean François, François Denizot, Marie Françoise Luciani, Magali Roux-Dosseto, Marie Suzan, Marie Geneviève Mattei, and Pierre Golstein. 1987. "A New Member of the Immunoglobulin Superfamily--CTLA-4." *Nature* 328 (6127): 267–70. <https://doi.org/10.1038/328267A0>.
- Bruzzone, S, L Guida, E Zocchi, L Franco, and Antonio De Flora. 2001. "Connexin 43 Hemi Channels Mediate Ca²⁺-Regulated Transmembrane NAD⁺ Fluxes in Intact Cells." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (1): 10–12. <https://doi.org/10.1096/FJ.00-0566FJE>.
- Bubici, Concetta, and Salvatore Papa. 2014. "JNK Signalling in Cancer: In Need of New, Smarter Therapeutic Targets." *British Journal of Pharmacology* 171 (1): 24–37. <https://doi.org/10.1111/BPH.12432>.
- Buell, G., I.P. Chessell, A.D. Michel, G. Collo, M. Salazzo, S. Herren, D. Gretener, et al. 1998. "Blockade of Human P2X7 Receptor Function With a Monoclonal Antibody." *Blood* 92 (10): 3521–28. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V92.10.3521>.
- Buell, Gary N., Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, and Antonarakis SE. 1998. "Gene Structure and Chromosomal Localization of the Human P2X7 Receptor." *Receptors & Channels* 5 (6): 347–54. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/9826911/>.
- Buisman, H. P., T. H. Steinberg, J. Fischbarg, S. C. Silverstein, S. A. Vogelzang, C. Ince, D. L. Ypey, and P. C.J. Leijh. 1988. "Extracellular ATP Induces a Large Nonselective Conductance in Macrophage Plasma Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (21): 7988–92. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.21.7988>.
- Burnstock, G. 1976. "Purinergeric Receptors." *Journal of Theoretical Biology* 62 (2): 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8).
- Burnstock, G., G. Campbel, D. Satchell, and ANNE Smythe. 1970. "Evidence That Adenosine Triphosphate or a Related Nucleotide Is the Transmitter Substance Released by Non-Adrenergic Inhibitory Nerves in the Gut." *British Journal of Pharmacology* 40 (4): 668–88. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1970.TB10646.X>.
- Burnstock, G, and C Kennedy. 1985. "Is There a Basis for Distinguishing Two Types of P2-Purinoceptor?" *General Pharmacology* 16 (5): 433–40. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1).
- Burnstock, G, and GE Knight. 2004. "Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems." *International Review of Cytology* 240 (SPEC.ISS.): 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3).
- Burnstock, Geoffrey. 1990. *Purinergeric Receptors-Subclassification and Physiological Roles*.
- . 2006. "Purinergeric Signalling." *British Journal of Pharmacology* 147 (SUPPL. 1): S172–81. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706429>.
- . 2017. "Purinergeric Signalling: Therapeutic Developments." *Frontiers in Pharmacology* 8 (September). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00661>.
- Burnstock, Geoffrey, and Gillian E. Knight. 2004. "Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems." *International Review of Cytology* 240 (SPEC.ISS.): 31–304.

- [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3).
- — —. 2018. "The Potential of P2X7 Receptors as a Therapeutic Target, Including Inflammation and Tumour Progression." *Purinergic Signalling* 14 (1). <https://doi.org/10.1007/S11302-017-9593-0>.
- Burnstock, Geoffrey, and Francesco Di Virgilio. 2013. "Purinergic Signalling and Cancer." *Purinergic Signalling* 9 (4): 491. <https://doi.org/10.1007/S11302-013-9372-5>.
- Cacciari, Barbara, Giorgia Pastorin, Chiara Bolcato, Giampiero Spalluto, Magdalena Bacilieri, and Stefano Moro. 2005. "A2B Adenosine Receptor Antagonists: Recent Developments." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 5 (12): 1053–60. <https://doi.org/10.2174/138955705774933374>.
- Carvalho, Kevin, Elodie Martin, Aurélie Ces, Nadège Sarrazin, Pauline Lagouge-Roussey, Caroline Nous, Leyna Boucherit, et al. 2021. "P2X7-Deficiency Improves Plasticity and Cognitive Abilities in a Mouse Model of Tauopathy." *Progress in Neurobiology* 206 (November): 102139. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2021.102139>.
- Cesaro, Annabelle, Patrick Brest, Véronique Hofman, Xavier Hébuterne, Scott Wildman, Bernard Ferrua, Sandrine Marchetti, et al. 2010. "Amplification Loop of the Inflammatory Process Is Induced by P2X7R Activation in Intestinal Epithelial Cells in Response to Neutrophil Transepithelial Migration." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 299 (1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00282.2009>.
- Charras, G.T. 2008. "A Short History of Blebbing." *Journal of Microscopy* 231 (3): 466–78. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.2008.02059.X>.
- Cheewatrakoolpong, B, H Gilchrest, JC Anthes, and S Greenfeder. 2005. "Identification and Characterization of Splice Variants of the Human P2X7 ATP Channel." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (1): 17–27. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.04.087>.
- Chekeni, FB, MR Elliott, JK Sandilos, SF Walk, JM Kinchen, ER Lazarowski, AJ Armstrong, et al. 2010. "Pannexin 1 Channels Mediate 'find-Me' Signal Release and Membrane Permeability during Apoptosis." *Nature* 467 (7317): 863–67. <https://doi.org/10.1038/NATURE09413>.
- Chen, Guo, Wei Xie, Jihoon Nah, Allan Sauvat, Peng Liu, Federico Pietrocola, Valentina Sica, et al. 2019. "3,4-Dimethoxychalcone Induces Autophagy through Activation of the Transcription Factors TFE3 and TFEF." *EMBO Molecular Medicine* 11 (11). <https://doi.org/10.15252/EMMM.201910469>.
- Chen, Lanfen, and Celia F. Brosnan. 2006. "Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in P2X7 R^{-/-} Mice: Evidence for Loss of Apoptotic Activity in Lymphocytes." *The Journal of Immunology* 176 (5): 3115–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3115>.
- Chessell, Iain P., Jonathan P. Hatcher, Chas Bountra, Anton D. Michel, Jane P. Hughes, Paula Green, Julie Egerton, et al. 2005. "Disruption of the P2X7 Purinoceptor Gene Abolishes Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain." *Pain* 114 (3): 386–96. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.01.002>.
- Cicko, Sanja, Thomas Christian Köhler, Cemil Korcan Ayata, Tobias Müller, Nicolas Ehrat, Anja Meyer, Madelon Hossfeld, et al. 2018. "Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X7 Receptor in a LPS Mediated Inflammation (ARDS/ALI)." *Oncotarget* 9 (55): 30635–48. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.25761>.
- Clark, Wallace H., David E. Elder, Dupont Guerry, Leonard E. Braitman, Bruce J. Trock, Delray Schultz, Marie Synnestvedt, and Allan C. Halpern. 1989. "Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression." *Journal of the National Cancer Institute* 81 (24): 1893–1904. <https://doi.org/10.1093/JNCI/81.24.1893>.
- Cockcroft, S., and B. D. Gomperts. 1979. "ATP Induces Nucleotide Permeability in Rat Mast Cells." *Nature* 279:5713 279 (5713): 541–42. <https://doi.org/10.1038/279541A0>.
- Coddou, Claudio, Stanko S. Stojilkovic, and J. Pablo Huidobro-Toro. 2011. "Allosteric Modulation of ATP-Gated P2X Receptor Channels." *Reviews in the Neurosciences* 22 (3): 335–54. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.014/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- Coddou, Claudio, Zonghe Yan, Tomas Obsil, J. Pablo Huidobro-Toro, and Stanko S. Stojilkovic. 2011. "Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels." *Pharmacological Reviews* 63 (3): 641–83. <https://doi.org/10.1124/PR.110.003129>.
- Collo, G, S Neidhart, E Kawashima, M Kosco-Vilbois, R A North, and G Buell. 1997. "Tissue Distribution of the P2X7 Receptor" 36 (9): 1277–83.
- Communi, Didier, Nathalie Suarez Gonzalez, Michel Detheux, Sté Phane Bré, Vincent Lannoy, Marc Parmentier, and Jean-Marie Boeynaems. 2001. "Identification of a Novel Human ADP Receptor Coupled to G i *." <https://doi.org/10.1074/jbc.M105912200>.
- Compan, Vincent, Lauriane Ulmann, Olga Stelmashenko, Jean Chemin, Séverine Chaumont, and Francois

- Rassendren. 2012. "P2X2 and P2X5 Subunits Define a New Heteromeric Receptor with P2X7-Like Properties." *Journal of Neuroscience* 32 (12): 4284–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012>.
- Cotrina, Maria Luisa, and Maiken Nedergaard. 2009. "Physiological and Pathological Functions of P2X7 Receptor in the Spinal Cord." *Purinergic Signalling* 2009 5:2 5 (2): 223–32. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9138-2>.
- Courageot, MP, S Lépine, M Hours, F Giraud, and JC Sulpice. 2004. "Involvement of Sodium in Early Phosphatidylserine Exposure and Phospholipid Scrambling Induced by P2X7 Purinoceptor Activation in Thymocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 21815–23. <https://doi.org/10.1074/JBC.M401426200>.
- Coutinho-Silva, R, L Stahl, MN Raymond, T Jungas, P Verbeke, G Burnstock, T Darville, and DM Ojcius. 2003. "Inhibition of Chlamydial Infectious Activity Due to P2X7R-Dependent Phospholipase D Activation." *Immunity* 19 (3): 403–12. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00235-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00235-8).
- Cruz, Cristiane M., Alessandra Rinna, Henry Jay Forman, Ana L.M. Ventura, Pedro M. Persechini, and David M. Ojcius. 2007. "ATP Activates a Reactive Oxygen Species-Dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages." *Journal of Biological Chemistry* 282 (5): 2871–79. <https://doi.org/10.1074/JBC.M608083200>.
- Cruz, Cristiane Monteiro Da, Ana Lúcia Marques Ventura, Julieta Schachter, Helio Miranda Costa, Hercules Antonio Da Silva Souza, Fernanda Ramos Gomes, Robson Coutinho-Silva, David M. Ojcius, and Pedro Muanis Persechini. 2006. "Activation of ERK1/2 by Extracellular Nucleotides in Macrophages Is Mediated by Multiple P2 Receptors Independently of P2X7-Associated Pore or Channel Formation." *British Journal of Pharmacology* 147 (3): 324–34. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706559>.
- Dal Ben, Diego, Michela Buccioni, Catia Lambertucci, Gabriella Marucci, Ajiroghene Thomas, and Rosaria Volpini. 2015. "Purinergic P2X Receptors: Structural Models and Analysis of Ligand-Target Interaction." *European Journal of Medicinal Chemistry* 89 (January): 561–80. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.10.071>.
- Dang, Eric V., Joseph Barbi, Huang Yu Yang, Dilini Jinasena, Hong Yu, Ying Zheng, Zachary Bordman, et al. 2011. "Control of T(H)17/T(Reg) Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1." *Cell* 146 (5): 772–84. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.07.033>.
- Danquah, Welbeck, Meyer Schwesinger Catherine, Björn Rissiek, Carolina Pinto, Serracant Prat Arnau, Miriam Amadi, Domenica Iacenda, et al. 2016. "Nanobodies That Block Gating of the P2X7 Ion Channel Ameliorate Inflammation." *Science Translational Medicine* 8 (366). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>.
- Deaglio, Silvia, Karen M. Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang Fan Chen, et al. 2007. "Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression" 204 (6): 1257–65. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/17502665/>.
- Deaglio, Silvia, and Simon C. Robson. 2011. "Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity." In *Advances in Pharmacology*, 61:301–32. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2>.
- Dell'Antonio, Giacomo, Angelo Quattrini, Elena Dal Cin, Alessandro Fulgenzi, and Maria Elena Ferrero. 2002. "Antinociceptive Effect of a New P2Z/P2X7 Antagonist, Oxidized ATP, in Arthritic Rats." *Neuroscience Letters* 327 (2): 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00385-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00385-3).
- Demeules, Mélanie, Allan Scarpitta, Catalina Abad, Henri Gondé, Romain Hardet, Carolina Pinto-Espinoza, Anna Marei Eichhoff, et al. 2020. "Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using RAAV Vector and Nanobodies (AAVnano)." *Frontiers in Oncology* 10 (September): 1699. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01699/BIBTEX>.
- Deng, Liufu, Hua Liang, Meng Xu, Xuanming Yang, Byron Burnette, Ainhua Arina, Xiao Dong Li, et al. 2014. "STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors." *Immunity* 41 (5): 843–52. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>.
- Denlinger, Loren C., Philip L. Fiset, Julie A. Sommer, Jyoti J. Watters, Usha Prabhu, George R. Dubyak, Richard A. Proctor, and Paul J. Bertics. 2001. "Cutting Edge: The Nucleotide Receptor P2X7 Contains Multiple Protein- and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (4): 1871–76. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.4.1871>.

- Denlinger, Loren C, Douglas B Coursin, Kathleen Schell, Giuditta Angelini, Dawn N Green, Arturo G Guadarrama, Jennifer Halsey, Usha Prabhu, Kirk J Hogan, and Paul J Bertics. 2006. "Human P2X7 Pore Function Predicts Allele Linkage Disequilibrium." *Clinical Chemistry* 52 (6): 995–1004. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.065425>.
- Deterre, P, L Gelman, H Gary-Gouy, C Arrieumerlou, V Berthelie, J M Tixier, S Ktorza, J Goding, C Schmitt, and G Bismuth. 1996. "Coordinated Regulation in Human T Cells of Nucleotide-Hydrolyzing Ecto-Enzymatic Activities, Including CD38 and PC-1. Possible Role in the Recycling of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolites." *The Journal of Immunology* 157 (4).
- Di, Anke, Shiqin Xiong, Zhiming Ye, R.K. Subbarao Malireddi, Satoshi Kometani, Ming Zhong, Manish Mittal, et al. 2018. "The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation." *Immunity* 49 (1): 56. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.04.032>.
- Díaz-Rodríguez, E, JC Montero, A Esparís-Ogando, L Yuste, and A Pandiella. 2002. "Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylates Tumor Necrosis Factor Alpha-Converting Enzyme at Threonine 735: A Potential Role in Regulated Shedding." *Molecular Biology of the Cell* 13 (6): 2031–44. <https://doi.org/10.1091/MBC.01-11-0561>.
- Dinarello, CA. 2009. "Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family." *Annual Review of Immunology* 27: 519–50. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132612>.
- Ding, Jingjin, Kun Wang, Wang Liu, Yang She, Qi Sun, Jianjin Shi, Hanzi Sun, Da Cheng Wang, and Feng Shao. 2016. "Pore-Forming Activity and Structural Autoinhibition of the Gasdermin Family." *Nature* 535 (7610): 111–16. <https://doi.org/10.1038/NATURE18590>.
- Dong, Peixin, Ying Xiong, Junming Yue, Sharon J.B. Hanley, and Hidemichi Watari. 2018. "Tumor-Intrinsic PD-L1 Signaling in Cancer Initiation, Development and Treatment: Beyond Immune Evasion." *Frontiers in Oncology* 8 (SEP). <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00386>.
- Donnelly-Roberts, Diana L., Marian T. Namovic, Bruce Surber, Srirajan X. Vaidyanathan, Arturo Perez-Medrano, Ying Wang, William A. Carroll, and Michael F. Jarvis. 2009. "[3H]A-804598 ([3H]2-Cyano-1-[(1S)-1-Phenylethyl]-3-Quinolin-5-Ylguanidine) Is a Novel, Potent, and Selective Antagonist Radioligand for P2X7 Receptors." *Neuropharmacology* 56 (1): 223–29. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.06.012>.
- Donnelly-Roberts, Diana L, Marian T Namovic, Ping Han, and Michael F Jarvis. 2009. "Mammalian P2X7 Receptor Pharmacology: Comparison of Recombinant Mouse, Rat and Human P2X7 Receptors." *British Journal of Pharmacology* 157 (7): 1203. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00233.X>.
- Douguet, Laetitia, Serena Janho dit Hreich, Jonathan Benzaquen, Laetitia Seguin, Thierry Juhel, Xavier Dezitter, Christophe Duranton, et al. 2021. "A Small-Molecule P2RX7 Activator Promotes Anti-Tumor Immune Responses and Sensitizes Lung Tumor to Immunotherapy." *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-20912-2>.
- Drill, Matthew, Nigel C. Jones, Martin Hunn, Terence J. O'Brien, and Mastura Monif. 2021. "Antagonism of the ATP-Gated P2X7 Receptor: A Potential Therapeutic Strategy for Cancer." *Purinergic Signalling* 17 (2): 215. <https://doi.org/10.1007/S11302-021-09776-9>.
- Duncan, JA, DT Bergstralh, Y Wang, SB Willingham, Z Ye, AG Zimmermann, and JP Ting. 2007. "Cryopyrin/NALP3 Binds ATP/DATP, Is an ATPase, and Requires ATP Binding to Mediate Inflammatory Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (19): 8041–46. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0611496104>.
- Dwyer, Karen M., Silvia Deaglio, Wenda Gao, David Friedman, Terry B. Strom, and Simon C. Robson. 2007. "CD39 and Control of Cellular Immune Responses." *Purinergic Signalling* 3 (1–2): 171. <https://doi.org/10.1007/S11302-006-9050-Y>.
- Eichhoff, Anna Marei, Kathleen Börner, Birte Albrecht, Waldemar Schäfer, Natalie Baum, Friedrich Haag, Jakob Körbelin, et al. 2019. "No Title." *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 15 (December): 211–20. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.003>.
- El-Moatassim, C., and G. R. Dubyak. 1992. "A Novel Pathway for the Activation of Phospholipase D by P2z Purinergic Receptors in BAC1.2F5 Macrophages." *Journal of Biological Chemistry* 267 (33): 23664–73. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35890-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35890-3).
- Elliott, James I., Annmarie Surprenant, Federica M. Marelli-Berg, Joanne C. Cooper, Robin L. Cassidy-Cain, Carol Wooding, Kenneth Linton, Denis R. Alexander, and Christopher F. Higgins. 2005. "Membrane Phosphatidylserine Distribution as a Non-Apoptotic Signalling Mechanism in Lymphocytes." *Nature Cell Biology* 2005 7:8 7 (8): 808–16. <https://doi.org/10.1038/NCB1279>.
- Elliott, Michael R., Faraaz B. Chekeni, Paul C. Trampont, Eduardo R. Lazarewski, Alexandra Kadl, Scott F. Walk, Daeho Park, et al. 2009. "Nucleotides Released by Apoptotic Cells Act as a Find-Me Signal to Promote

- Phagocytic Clearance." *Nature* 461 (7261): 282–86. <https://doi.org/10.1038/nature08296>.
- Elsas, Andrea Van, Arthur A. Hurwitz, and James P. Allison. 1999. "Combination Immunotherapy of B16 Melanoma Using Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)-Producing Vaccines Induces Rejection of Subcutaneous and Metastatic Tumors Accompanied by Autoimmune Depigmentation." *The Journal of Experimental Medicine* 190 (3): 355–66. <https://doi.org/10.1084/JEM.190.3.355>.
- Eltzschig, Holger K., David Köhler, Tobias Eckle, Tianqing Kong, Simon C. Robson, and Sean P. Colgan. 2009. "Central Role of Sp1-Regulated CD39 in Hypoxia/Ischemia Protection." *Blood* 113 (1): 224. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-06-165746>.
- Evans, R. J. 2009. "Orthosteric and Allosteric Binding Sites of P2X Receptors." *European Biophysics Journal* 38 (3): 319–27. <https://doi.org/10.1007/S00249-008-0275-2/TABLES/1>.
- Fairbairn, Ian P., Carmel B. Stober, Dinakantha S. Kumararatne, and David A. Lammas. 2001. "ATP-Mediated Killing of Intracellular Mycobacteria by Macrophages Is a P2X7-Dependent Process Inducing Bacterial Death by Phagosome-Lysosome Fusion." *The Journal of Immunology* 167 (6): 3300–3307. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.6.3300>.
- Faliti, Caterina E., Roberta Gualtierotti, Elsa Rottoli, Maria Gerosa, Lisa Perruzza, Andrea Romagnani, Giovanni Pellegrini, et al. 2019. "P2X7 Receptor Restrains Pathogenic Tfh Cell Generation in Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Experimental Medicine* 216 (2): 317–36. <https://doi.org/10.1084/jem.20171976>.
- Fang, Tao, Xiaotang Lu, Daniel Berger, Christina Gmeiner, Julia Cho, Richard Schalek, Hidde Ploegh, and Jeff Lichtman. 2018. "Nanobody Immunostaining for Correlated Light and Electron Microscopy with Preservation of Ultrastructure." *Nature Methods* 15 (12): 1029–32. <https://doi.org/10.1038/S41592-018-0177-X>.
- Feng, Lili, Xiaofeng Sun, Eva Csizmadia, Lihui Han, Shu Bian, Takashi Murakami, Xin Wang, Simon C. Robson, and Yan Wu. 2011. "Vascular CD39/ENTPD1 Directly Promotes Tumor Cell Growth by Scavenging Extracellular Adenosine Triphosphate." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 13 (3): 206. <https://doi.org/10.1593/NEO.101332>.
- Feng, Ying-Hong, Xin Li, Liqin Wang, Lingying Zhou, and George I. Gorodeski. 2006. "A Truncated P2X7 Receptor Variant (P2X7-j) Endogenously Expressed in Cervical Cancer Cells Antagonizes the Full-Length P2X7 Receptor through Hetero-Oligomerization." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (25): 17228. <https://doi.org/10.1074/JBC.M602999200>.
- Fernández, Dominique, Felipe Flores-Santibáñez, Jocelyn Neira, Francisco Osorio-Barrios, Gabriela Tejón, Sarah Nuñez, Yessia Hidalgo, et al. 2016. "Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity." *PloS One* 11 (6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157889>.
- Ferrari, D., C. Pizzirani, S. Gulinelli, G. Callegari, P. Chiozzi, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2007. "Modulation of P2X7 Receptor Functions by Polymyxin B: Crucial Role of the Hydrophobic Tail of the Antibiotic Molecule." *British Journal of Pharmacology* 150 (4): 445–54. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706994>.
- Ferrari, D, P Chiozzi, S Falzoni, M Dal Susino, G Collo, G Buell, and F Di Virgilio. 1997. "ATP-Mediated Cytotoxicity in Microglial Cells." *Neuropharmacology* 36 (9): 1295–1301. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00137-8).
- Ferrari, D, S Wesselborg, MK Bauer, and K Schulze-Osthoff. 1997. "Extracellular ATP Activates Transcription Factor NF-KappaB through the P2Z Purinoreceptor by Selectively Targeting NF-KappaB P65." *The Journal of Cell Biology* 139 (7): 1635–43. <https://doi.org/10.1083/JCB.139.7.1635>.
- Ferrari, Davide, Marco Idzko, Stefan Dichmann, Daniela Purlis, Christian Virchow, Johannes Norgauer, Paola Chiozzi, Francesco Di Virgilio, and Werner Luttmann. 2000. "P2 Purinergic Receptors of Human Eosinophils: Characterization and Coupling to Oxygen Radical Production." *FEBS Letters* 486 (3): 217–24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02306-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02306-1).
- Ferrari, Davide, Andrea La Sala, Paola Chiozzi, Anna Morelli, Simonetta Falzoni, Giampiero Girolomoni, Marco Idzko, Stefan Dichmann, Johannes Norgauer, and Francesco Di Virgilio. 2000. "The P2 Purinergic Receptors of Human Dendritic Cells: Identification and Coupling to Cytokine Release." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (15): 2466–76. <https://doi.org/10.1096/FJ.00-0031COM>.
- Ferrari, Davide, Sebastian Wesselborg, Manuel K.A. Bauer, and Klaus Schulze-Osthoff. 1997. "Extracellular ATP Activates Transcription Factor NF-KB through the P2Z Purinoreceptor by Selectively Targeting NF-KB P65 (RelA)." *Journal of Cell Biology* 139 (7): 1635–43. <https://doi.org/10.1083/JCB.139.7.1635>.
- Flittiger, B., M. Klapperstück, G. Schmalzing, and F. Markwardt. 2010. "Effects of Protons on Macroscopic and

- Single-Channel Currents Mediated by the Human P2X7 Receptor." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798 (5): 947–57. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2010.01.023>.
- Forrester, T., and Carole A. Williams. 1977. "Release of Adenosine Triphosphate from Isolated Adult Heart Cells in Response to Hypoxia." *The Journal of Physiology* 268 (2): 371–90. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1977.SP011862>.
- Foster, JG, E Carter, I Kilty, AB MacKenzie, and SG Ward. 2013. "Mitochondrial Superoxide Generation Enhances P2X7R-Mediated Loss of Cell Surface CD62L on Naive Human CD4+ T Lymphocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (4): 1551–59. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1201510>.
- Fran, Françoise, Françoise Wilkin, Patrick Stordeur, Michel Goldman, Jean-Marie Boeynaems, and Bernard Robaye. 2002. "Extracellular Adenine Nucleotides Modulate Cytokine Production by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: Dual Effect on IL-12 and Stimulation of IL-10."
- Franceschini, Alessia, Marina Capece, Paola Chiozzi, Simonetta Falzoni, Juana Maria Sanz, Alba Clara Sarti, Massimo Bonora, Paolo Pinton, and Francesco Di Virgilio. 2015. "The P2X7 Receptor Directly Interacts with the NLRP3 Inflammasome Scaffold Protein." *The FASEB Journal* 29 (6): 2450–61. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-268714>.
- Franchi, L, N Warner, K Viani, and G Nuñez. 2009. "Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense." *Immunological Reviews* 227 (1): 106–28. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2008.00734.X>.
- Fredholm, Bertil, Rodrigo Cunha, and Per Svenningsson. 2003. "Pharmacology of Adenosine A2A Receptors and Therapeutic Applications." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3 (4): 413–26. <https://doi.org/10.2174/1568026033392200>.
- Freeman, Gordon J., Andrew J. Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J. Fitz, et al. 2000. "Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027–34. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.7.1027>.
- Friedle, Scott A., Marjorie A. Curet, and Jyoti J. Watters. 2010. "Recent Patents on Novel P2x7 Receptor Antagonists and Their Potential for Reducing Central Nervous System Inflammation." *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 5 (1): 35–45. <https://doi.org/10.2174/157488910789753530>.
- Fu, Haiyan, Joseph Muenzer, Richard J. Samulski, George Breese, Jerillyn Sifford, Xinhua Zeng, and Douglas M. McCarty. 2003. "Self-Complementary Adeno-Associated Virus Serotype 2 Vector: Global Distribution and Broad Dispersion of AAV-Mediated Transgene Expression in Mouse Brain." *Molecular Therapy* 8 (6): 911–17. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2003.08.021>.
- Fuller, Stephen J., Leanne Stokes, Kristen K. Skarratt, Ben J. Gu, and James S. Wiley. 2009. "Genetics of the P2X7 Receptor and Human Disease." *Purinergic Signalling* 5 (2): 257. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9136-4>.
- Furini, Federica, Anna Lisa Giuliani, Mattia Erminio Parlati, Marcello Govoni, Francesco Di Virgilio, and Alessandra Bortoluzzi. 2019. "P2X7 Receptor Expression in Patients with Serositis Related to Systemic Lupus Erythematosus." *Frontiers in Pharmacology* 10 (APR): 435. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00435/BIBTEX>.
- Furlan-Freguia, Christian, Patrizia Marchese, András Gruber, Zaverio M. Ruggeri, and Wolfram Ruf. 2011. "P2X7 Receptor Signaling Contributes to Tissue Factor-Dependent Thrombosis in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2932–44. <https://doi.org/10.1172/JCI46129>.
- Galluzzi, Lorenzo, Aitziber Buqué, Oliver Kepp, Laurence Zitvogel, and Guido Kroemer. 2017. "Immunogenic Cell Death in Cancer and Infectious Disease." *Nature Reviews. Immunology* 17 (2): 97–111. <https://doi.org/10.1038/NRI.2016.107>.
- Gao, Guang Ping, Mauricio R. Alvira, Lili Wang, Roberto Calcedo, Jule Johnston, and James M. Wilson. 2002. "Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11854–59. <https://doi.org/10.1073/PNAS.182412299>.
- Gao, Guangping, Luk H. Vandenberghe, Mauricio R. Alvira, You Lu, Roberto Calcedo, Xiangyang Zhou, and James M. Wilson. 2004. "Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues." *Journal of Virology* 78 (12): 6381–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6381-6388.2004>.
- Garavaglia, Silvia, Santina Bruzzzone, Camilla Cassani, Laura Canella, Gianna Allegrone, Laura Sturla, Elena Mannino, Enrico Millo, Antonio De Flora, and Menico Rizzi. 2012. "The High-Resolution Crystal Structure of Periplasmic Haemophilus Influenzae NAD Nucleotidase Reveals a Novel Enzymatic Function of Human CD73 Related to NAD Metabolism." *The Biochemical Journal* 441 (1): 131–41.

- <https://doi.org/10.1042/BJ20111263>.
- Garbers, Christoph, Nathalie Jänner, Athena Chalaris, Marcia L. Moss, Doreen M. Floss, Dörte Meyer, Friedrich Koch-Nolte, Stefan Rose-John, and Jürgen Scheller. 2011. "Species Specificity of ADAM10 and ADAM17 Proteins in Interleukin-6 (IL-6) Trans-Signaling and Novel Role of ADAM10 in Inducible IL-6 Receptor Shedding." *Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 14804–11. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.229393>.
- Garcia-Diaz, Angel, Daniel Sanghoon Shin, Blanca Homet Moreno, Justin Saco, Helena Escuin-Ordinas, Gabriel Abril Rodriguez, Jesse M. Zaretsky, et al. 2017. "Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression." *Cell Reports* 19 (6): 1189. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.04.031>.
- Garg, A. D., S. Martin, J. Golab, and P. Agostinis. 2014. "Danger Signalling during Cancer Cell Death: Origins, Plasticity and Regulation." *Cell Death and Differentiation* 21 (1): 26–38. <https://doi.org/10.1038/CDD.2013.48>.
- Gargett, Cornish, and James S. Wiley. 1996. "Phospholipase D Activation by P2Z-Purinoceptor Agonists in Human Lymphocytes Is Dependent on Bivalent Cation Influx." *The Biochemical Journal* 313 (Pt 2 (Pt 2): 529–35. <https://doi.org/10.1042/BJ3130529>.
- Geoghegan, James C., Gundo Diedrich, Xiaojun Lu, Kim Rosenthal, Kris F. Sachsenmeier, Herren Wu, William F. Dall'Acqua, and Melissa M. Damschroder. 2016. "Inhibition of CD73 AMP Hydrolysis by a Therapeutic Antibody with a Dual, Non-Competitive Mechanism of Action." *MAbs* 8 (3): 454–67. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1143182>.
- Ghetie, Victor, Serguei Popov, Jozef Borvak, Caius Radu, Diana Matesoi, Corneliu Medesan, Raimund J. Ober, and E. Sally Ward. 1997. "Increasing the Serum Persistence of an IgG Fragment by Random Mutagenesis." *Nature Biotechnology* 15 (7): 637–40. <https://doi.org/10.1038/NBT0797-637>.
- Ghiringhelli, François, Lionel Apetoh, Antoine Tesniere, Laetitia Aymeric, Yuting Ma, Carla Ortiz, Karim Vermaelen, et al. 2009. "Activation of the NLRP3 Inflammasome in Dendritic Cells Induces IL-1B-Dependent Adaptive Immunity against Tumors." *Nature Medicine* 15 (10): 1170–78. <https://doi.org/10.1038/nm.2028>.
- Gilbert, Sm, Cj Oliphant, S. Hassan, Al Peille, P. Bronsert, S. Falzoni, F. Di Virgilio, S. McNulty, and R. Lara. 2019. "ATP in the Tumour Microenvironment Drives Expression of NfP2X 7 , a Key Mediator of Cancer Cell Survival." *Oncogene* 38 (2). <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0426-6>.
- Giraudon Paoli, Marc, Severine Augier, Marilyne Royannez Blemont, Céline Rodriguez, Hélène Rispaud Blanc, Stéphanie Chanteux, Nicolas Gourdin, et al. 2016. "Abstract 2344: Discovery and Characterization of New Original Blocking Antibodies Targeting the CD73 Immune Checkpoint for Cancer Immunotherapy." *Cancer Research* 76 (14_Supplement): 2344–2344. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-2344>.
- Giuliani, Anna Lisa, Alba Clara Sarti, and Francesco Di Virgilio. 2019. "Extracellular Nucleotides and Nucleosides as Signalling Molecules." *Immunology Letters* 205 (January): 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2018.11.006>.
- . 2021. "Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation." *Frontiers in Pharmacology* 11 (February): 2419. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.619458/BIBTEX>.
- Goldszmid, Romina S., Amiran Dzutsev, and Giorgio Trinchieri. 2014. "Host Immune Response to Infection and Cancer: Unexpected Commonalities." *Cell Host & Microbe* 15 (3): 295–305. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2014.02.003>.
- Gomperts, B. D. 1983. "Involvement of Guanine Nucleotide-Binding Protein in the Gating of Ca²⁺ by Receptors." *Nature* 1983 306:5938 306 (5938): 64–66. <https://doi.org/10.1038/306064A0>.
- Gonnord, P., C. Delarasse, R. Auger, K. Benihoud, M. Prigent, M. H. Cuif, C. Lamaze, and J. M. Kanellopoulos. 2009. "Palmitoylation of the P2X7 Receptor, an ATP-Gated Channel, Controls Its Expression and Association with Lipid Rafts." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (3): 795–805. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-114637>.
- Gordon. 1986. "Extracellular ATP: Effects, Sources and Fate." *The Biochemical Journal* 233 (2): 309–19. <https://doi.org/10.1042/BJ2330309>.
- Grassi, Fabio, and Benedetta De Ponte Conti. 2021. "The P2X7 Receptor in Tumor Immunity." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (June). <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.694831>.
- Greenberg, Andrew S., David Avila, Marianne Hughes, Austin Hughes, E. Churchill McKinney, and Martin F. Flajnik. 1995. "A New Antigen Receptor Gene Family That Undergoes Rearrangement and Extensive Somatic Diversification in Sharks." *Nature* 374 (6518): 168–73. <https://doi.org/10.1038/374168A0>.
- Grigoriu-Serbanescu, Maria, Stefan Herms, Thomas W. Mühleisen, Alexander Georgi, Carmen C. Diaconu, Jana

- Strohmaier, Piotr Czerski, et al. 2009. "Variation in P2RX7 Candidate Gene (Rs2230912) Is Not Associated with Bipolar I Disorder and Unipolar Major Depression in Four European Samples." *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 150B (7): 1017–21. <https://doi.org/10.1002/AJMG.B.30952>.
- Grimm, Dirk, Kusum Pandey, Hiroyuki Nakai, Theresa A. Storm, and Mark A. Kay. 2006. "Liver Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus Is Primarily Restricted by Capsid Serotype Not Vector Genotype." *Journal of Virology* 80 (1): 426–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.1.426-439.2006>.
- Grimm, Dirk, Shangzhon Zhou, Hiroyuki Nakai, Clare E. Thomas, Theresa A. Storm, Sally Fuess, Takashi Matsushita, et al. 2003. "Preclinical in Vivo Evaluation of Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors for Liver Gene Therapy." *Blood* 102 (7): 2412–19. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-02-0495>.
- Gross, O, H Poeck, M Bscheider, C Dostert, N Hanneschläger, S Endres, G Hartmann, et al. 2009. "Syk Kinase Signalling Couples to the Nlrp3 Inflammasome for Anti-Fungal Host Defence." *Nature* 459 (7245): 433–36. <https://doi.org/10.1038/NATURE07965>.
- Grötzinger, J, I Lorenzen, and S Düsterhöft. 2017. "Molecular Insights into the Multilayered Regulation of ADAM17: The Role of the Extracellular Region." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864 (11 Pt B): 2088–95. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2017.05.024>.
- Gu, B. J., W. Y. Zhang, L. J. Bendall, I. P. Chessell, G. N. Buell, and J. S. Wiley. 2000. "Expression of P2X7 Purinoceptors on Human Lymphocytes and Monocytes: Evidence for Nonfunctional P2X7 Receptors." <https://doi.org/10.1152/Ajpcell.2000.279.4.C1189> 279 (4 48-4): 1189–97.
- Gu, Ben J., Weiyi Zhang, Rebecca A. Worthington, Ronald Sluyter, Phuong Dao-Ung, Steven Petrou, Julian A. Barden, and James S. Wiley. 2001. "A Glu-496 to Ala Polymorphism Leads to Loss of Function of the Human P2X7 Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 276 (14): 11135–42. <https://doi.org/10.1074/JBC.M010353200>.
- Gu, Li Qun, Feng Ying Li, Lin Zhao, Yun Liu, Qian Chu, Xun Xiong Zang, Jian Min Liu, Guang Ning, and Yong Ju Zhao. 2010. "Association of XIAP and P2X7 Receptor Expression with Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma." *Endocrine* 38 (2): 276–82. <https://doi.org/10.1007/S12020-010-9384-7>.
- Guile, Simon D., Lilian Alcaraz, Timothy N. Birkinshaw, Keith C. Bowers, Mark R. Ebden, Mark Furber, and Michael J. Stocks. 2009. "Antagonists of the P2X7 Receptor. From Lead Identification to Drug Development." *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (10): 3123–41. <https://doi.org/10.1021/JM801528X>.
- Gunosewoyo, Hendra, and Michael Kassiou. 2010. "P2X Purinergic Receptor Ligands: Recently Patented Compounds." <http://Dx.Doi.Org/10.1517/13543771003702424> 20 (5): 625–46. <https://doi.org/10.1517/13543771003702424>.
- Gurusamy, Devikala, Amanda N. Henning, Tori N. Yamamoto, Zhiya Yu, Nikolaos Zacharakis, Sri Krishna, Rigel J. Kishton, et al. 2020. "Multi-Phenotype CRISPR-Cas9 Screen Identifies P38 Kinase as a Target for Adoptive Immunotherapies." *Cancer Cell* 37 (6): 818–833.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.05.004>.
- Guzman-Arangué, A, MJ Pérez de Lara, and J Pintor. 2017. "Hyperosmotic Stress Induces ATP Release and Changes in P2X7 Receptor Levels in Human Corneal and Conjunctival Epithelial Cells." *Purinergic Signalling* 13 (2): 249–58. <https://doi.org/10.1007/S11302-017-9556-5>.
- Haag, Friedrich, Sahil Adriouch, Anette Braß, Caroline Jung, Sina Möller, Felix Scheuplein, Peter Bannas, Michel Seman, and Friedrich Koch-Nolte. 2007a. *Extracellular NAD and ATP: Partners in Immune Cell Modulation. Purinergic Signalling*. Vol. 3. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9038-7>.
- . 2007b. "Extracellular NAD and ATP: Partners in Immune Cell Modulation." *Purinergic Signalling* 3 (1–2): 71–81. <https://doi.org/10.1007/S11302-006-9038-7/FIGURES/3>.
- Haanes, Kristian A., Albrecht Schwab, and Ivana Novak. 2012. "The P2X7 Receptor Supports Both Life and Death in Fibrogenic Pancreatic Stellate Cells." *PLOS ONE* 7 (12): e51164. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051164>.
- Hajnóczky, Robb-Gaspers, Seitz MB, and Thomas AP. 1995. "Decoding of Cytosolic Calcium Oscillations in the Mitochondria." *Cell* 82 (3): 415–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90430-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90430-1).
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hammers, E. Bajjana Songa, N. Bendahman, and R. Hammers. 1993. "Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains." *Nature* 193 363:6428 363 (6428): 446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Harkat, Mahboubi, Laurie Peverini, Adrien H. Cerdan, Kate Dunning, Juline Beudez, Adeline Martz, Nicolas Calimet, et al. 2017. "On the Permeation of Large Organic Cations through the Pore of ATP-Gated P2X Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (19):

- E3786–95. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1701379114>.
- Hashimoto-Hill, S., L. Friesen, M. Kim, and C. H. Kim. 2017. "Contraction of Intestinal Effector T Cells by Retinoic Acid-Induced Purinergic Receptor P2X7." *Mucosal Immunology* 10 (4): 912–23. <https://doi.org/10.1038/MI.2016.109>.
- Hatfield, Stephen M., Jorgen Kjaergaard, Dmitriy Lukashev, Bryan Belikoff, Taylor H. Schreiber, Shalini Sethumadhavan, Robert Abbott, et al. 2014. "Systemic Oxygenation Weakens the Hypoxia and Hypoxia Inducible Factor 1 α -Dependent and Extracellular Adenosine-Mediated Tumor Protection." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 92 (12): 1283–92. <https://doi.org/10.1007/S00109-014-1189-3>.
- Hattori, Fumie, Yasuhiro Ohshima, Shizuka Seki, Mitsutoshi Tsukimoto, Mitsuru Sato, Takato Takenouchi, Akina Suzuki, et al. 2012. "Feasibility Study of B16 Melanoma Therapy Using Oxidized ATP to Target Purinergic Receptor P2X7." *European Journal of Pharmacology* 695 (1–3): 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.09.001>.
- Hattori, Motoyuki, and Eric Gouaux. 2012. "Molecular Mechanism of ATP Binding and Ion Channel Activation in P2X Receptors." *Nature* 485 (7397): 207. <https://doi.org/10.1038/NATURE11010>.
- Hay, Carl M., Erin Sult, Qihui Huang, Kathy Mulgrew, Stacy R. Fuhrmann, Kelly A. McGlinchey, Scott A. Hammond, et al. 2016. "Targeting CD73 in the Tumor Microenvironment with MEDI9447." *Oncoimmunology* 5 (8). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1208875>.
- He, Wan-ting Ting, Haoqiang Wan, Lichen Hu, Pengda Chen, Xin Wang, Zhe Huang, Zhang-Hua Hua Yang, Chuan-Qi Qi Zhong, and Jiahuai Han. 2015. "Gasdermin D Is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1 β Secretion" 25 (12): 1285–98. <https://doi.org/10.1038/CR.2015.139>.
- Hibell, A. D., E. J. Kidd, I. P. Chessell, P. P.A. Humphrey, and A. D. Michel. 2000. "Apparent Species Differences in the Kinetic Properties of P2X7 Receptors." *British Journal of Pharmacology* 130 (1): 167–73. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703302>.
- Hibell, A. D., K. M. Thompson, J. Simon, M. Xing, P. P.A. Humphrey, and A. D. Michel. 2001. "Species- and Agonist-Dependent Differences in the Deactivation-Kinetics of P2X7 Receptors." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2001 363:6 363 (6): 639–48. <https://doi.org/10.1007/S002100100412>.
- Hilchey, Shannon P., James J. Kobie, Mathew R. Cochran, Shelley Secor-Socha, Jyh-Chiang E. Wang, Ollivier Hyrien, W. Richard Burack, Tim R. Mosmann, Sally A. Quataert, and Steven H. Bernstein. 2009. "Human Follicular Lymphoma CD39+ Infiltrating T Cells Contribute to Adenosine-Mediated T Cell Hyporesponsiveness." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (10): 6157–66. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900475>.
- Hirano, Fumiya, Katsumi Kaneko, Hideto Tamura, Haidong Dong, Shengdian Wang, Masao Ichikawa, Cecilia Rietz, et al. 2005. "Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity." *Cancer Research* 65 (3): 1089–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.1089.65.3>.
- Hofman, Paul, Julien Cherfils-Vicini, Marie Bazin, Marius Ilie, Thierry Juhel, Xavier Hébuterne, Eric Gilson, et al. 2015. "Genetic and Pharmacological Inactivation of the Purinergic P2RX7 Receptor Dampens Inflammation but Increases Tumor Incidence in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer." *Cancer Research* 75 (5): 835–45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1778>.
- Holland, M. C., J. U. Wurthner, P. J. Morley, M. A. Birchler, J. Lambert, M. Albayaty, A. P. Serone, et al. 2013. "Autoantibodies to Variable Heavy (VH) Chain Ig Sequences in Humans Impact the Safety and Clinical Pharmacology of a VH Domain Antibody Antagonist of TNF- α Receptor 1." *Journal of Clinical Immunology* 33 (7): 1192–1203. <https://doi.org/10.1007/S10875-013-9915-0>.
- Homolya, L, TH Steinberg, and RC Boucher. 2000. "Cell to Cell Communication in Response to Mechanical Stress via Bilateral Release of ATP and UTP in Polarized Epithelia." *The Journal of Cell Biology* 150 (6): 1349–59. <https://doi.org/10.1083/JCB.150.6.1349>.
- Honore, Prisca, Diana Donnelly-Roberts, Marian T. Namovic, Gin Hsieh, Chang Z. Zhu, Joe P. Mikusa, Gricelda Hernandez, et al. 2006. "A-740003 [N-(1-[[[(Cyanoimino)(5-Quinolinylamino) Methyl]Amino]-2,2-Dimethylpropyl)-2-(3,4-Dimethoxyphenyl)Acetamide], a Novel and Selective P2X7 Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319 (3): 1376–85. <https://doi.org/10.1124/JPET.106.111559>.
- Horváth, Gergely, Lilla Otrókocsi, Katinka Beko, Mária Baranyi, Ágnes Kittel, Pablo Antonio Fritz-Ruenes, and Beáta Sperlág. 2019. "P2X7 Receptors Drive Poly(I:C) Induced Autism-like Behavior in Mice." *Journal of Neuroscience* 39 (13): 2542–61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1895-18.2019>.
- Hu, Hongbo, Baohui Yang, Yumin Li, Subin Zhang, and Zheng Li. 2016. "Blocking of the P2X7 Receptor Inhibits the Activation of the MMP-13 and NF-KB Pathways in the Cartilage Tissue of Rats with Osteoarthritis." *International Journal of Molecular Medicine* 38 (6): 1922–32. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2016.2770>.

- Hubert, Sandra, Björn Rissiek, Katjana Klages, Jochen Huehn, Tim Sparwasser, Friedrich Haag, Friedrich Koch-Nolte, Olivier Boyer, Michel Seman, and Sahil Adriouch. 2010. "Extracellular NAD⁺ Shapes the Foxp3⁺ Regulatory T Cell Compartment through the ART2-P2X7 Pathway." *Journal of Experimental Medicine* 207 (12): 2561–68. <https://doi.org/10.1084/jem.20091154>.
- Humphreys, BD, J Rice, SB Kertesz, and GR Dubyak. 2000. "Stress-Activated Protein Kinase/JNK Activation and Apoptotic Induction by the Macrophage P2X7 Nucleotide Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 26792–98. <https://doi.org/10.1074/JBC.M002770200>.
- Idzko, Marco, Stefan Dichmann, Davide Ferrari, Francesco Di Virgilio, Andrea La Sala, Giampiero Girolomoni, Elisabeth Panther, and Johannes Norquauer. 2002. "Nucleotides Induce Chemotaxis and Actin Polymerization in Immature but Not Mature Human Dendritic Cells via Activation of Pertussis Toxin–Sensitive P2y Receptors." *Blood* 100 (3): 925–32. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.3.925>.
- Idzko, Marco, Hamida Hammad, Menno Van Nimwegen, Mirjam Kool, Monique A.M. Willart, Femke Muskens, Henk C. Hoogsteden, et al. 2007. "Extracellular ATP Triggers and Maintains Asthmatic Airway Inflammation by Activating Dendritic Cells." *Nature Medicine* 2007 13:8 13 (8): 913–19. <https://doi.org/10.1038/nm1617>.
- Ingram, Jessica R., Michael Dougan, Mohammad Rashidian, Marko Knoll, Edmund J. Keliher, Sarah Garrett, Scott Garforth, et al. 2017. "PD-L1 Is an Activation-Independent Marker of Brown Adipocytes." *Nature Communications* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00799-8>.
- Inoue, Kazuhide, and Makoto Tsuda. 2021. "Nociceptive Signaling Mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 Receptors." *Biochemical Pharmacology* 187 (May): 114309. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2020.114309>.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. "Induced Expression of PD-1, a Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, upon Programmed Cell Death." *The EMBO Journal* 11 (11): 3887–95. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05481.X>.
- Iwai, Yoshiko, Masayoshi Ishida, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Nagahiro Minato. 2002. "Involvement of PD-L1 on Tumor Cells in the Escape from Host Immune System and Tumor Immunotherapy by PD-L1 Blockade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19): 12293–97. <https://doi.org/10.1073/PNAS.192461099>.
- Jackson, Shaun W., Tomokazu Hoshi, Yan Wu, Xiaofeng Sun, Keiichi Enjyoji, Eva Cszimadia, Christian Sundberg, and Simon C. Robson. 2007. "Disordered Purinergic Signaling Inhibits Pathological Angiogenesis in Cd39/Entpd1-Null Mice." *The American Journal of Pathology* 171 (4): 1395. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2007.070190>.
- Jiang, Lin-Hua, Jocelyn Baldwin, Sébastien Roger, and Stephen Baldwin. 2013. "Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms." *Frontiers in Pharmacology* 0: 55. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2013.00055>.
- Jiang, Z. Gordon, Yan Wu, Eva Cszimadia, Linda Feldbrügge, Keiichi Enjyoji, John Tigges, Vasilis Toxavidis, et al. 2014. "Characterization of Circulating Microparticle-Associated CD39 Family Ecto-Nucleotidases in Human Plasma." *Purinergic Signalling* 10 (4): 611–18. <https://doi.org/10.1007/S11302-014-9423-6>.
- Jin, Dachuan, Jie Fan, Long Wang, Linda F. Thompson, Aijie Liu, Benjamin J. Daniel, Tahiro Shin, Tyler J. Curiel, and Bin Zhang. 2010. "CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression." *Cancer Research* 70 (6): 2245–55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3109/655773/P/CD73-ON-TUMOR-CELLS-IMPAIRS-ANTITUMOR-T-CELL>.
- Jouaville, LS, P Pinton, C Bastianutto, GA Rutter, and R Rizzuto. 1999. "Regulation of Mitochondrial ATP Synthesis by Calcium: Evidence for a Long-Term Metabolic Priming." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24): 13807–12. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13807>.
- Junger, Wolfgang G. 2011. "Immune Cell Regulation by Autocrine Purinergic Signalling." *Nature Reviews. Immunology* 11 (3): 201–12. <https://doi.org/10.1038/NRI2938>.
- Kaczmarek-Hajek, Karina, Jiong Zhang, Robin Kopp, Antje Grosche, Björn Rissiek, Anika Saul, Santina Bruzzone, et al. 2018. "Re-Evaluation of Neuronal P2X7 Expression Using Novel Mouse Models and a P2X7-Specific Nanobody." *ELife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36217>.
- Karasawa, A, K Michalski, P Mikhelzon, and T Kawate. 2017. "The P2X7 Receptor Forms a Dye-Permeable Pore Independent of Its Intracellular Domain but Dependent on Membrane Lipid Composition." *ELife* 6 (September). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.31186>.
- Karasawa, Akira, and Toshimitsu Kawate. 2016. "Structural Basis for Subtype-Specific Inhibition of the P2X7 Receptor." *ELife* 5 (DECEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.22153>.

- Kawate, Toshimitsu, Jennifer Carlisle Michel, William T. Birdsong, and Eric Gouaux. 2009. "Crystal Structure of the ATP-Gated P2X₄ Ion Channel in the Closed State." *Nature* 460 (7255): 592. <https://doi.org/10.1038/NATURE08198>.
- Kayagaki, Nobuhiko, Irma B. Stowe, Bettina L. Lee, Karen O'Rourke, Keith Anderson, Søren Warming, Trinna Cuellar, et al. 2015. "Caspase-11 Cleaves Gasdermin D for Non-Canonical Inflammasome Signalling." *Nature* 526 (7575): 666–71. <https://doi.org/10.1038/NATURE15541>.
- Kepp, Oliver, Lucillia Bezu, Takahiro Yamazaki, Francesco Di Virgilio, Mark J Smyth, Guido Kroemer, and Lorenzo Galluzzi. 2021. "ATP and Cancer Immunosurveillance." *The EMBO Journal* 40 (13): e108130. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108130>.
- Kepp, Oliver, Friedemann Loos, Peng Liu, and Guido Kroemer. 2017. "Extracellular Nucleosides and Nucleotides as Immunomodulators." *Immunological Reviews* 280 (1): 83–92. <https://doi.org/10.1111/IMR.12571>.
- Khakh, BS, XR Bao, C Labarca, and HA Lester. 1999. "Neuronal P2X Transmitter-Gated Cation Channels Change Their Ion Selectivity in Seconds." *Nature Neuroscience* 2 (4): 322–30. <https://doi.org/10.1038/7233>.
- Kido, Yuuka, Chiyo Kawahara, Yasuko Terai, Akihiro Ohishi, Satoshi Kobayashi, Miki Hayakawa, Yosuke Kamatsuka, Kentaro Nishida, and Kazuki Nagasawa. 2014. "Regulation of Activity of P2X₇ Receptor by Its Splice Variants in Cultured Mouse Astrocytes." *Glia* 62 (3): 440–51. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22615>.
- Killeen, Meaghan E., Laura Ferris, Erine A. Kupetsky, Louis Falo, and Alicia R. Mathers. 2013. "Signaling through Purinergic Receptors for ATP Induces Human Cutaneous Innate and Adaptive Th17 Responses: Implications in the Pathogenesis of Psoriasis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (8): 4324–36. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1202045>.
- Kim, M, LH Jiang, HL Wilson, RA North, and A Surprenant. 2001. "Proteomic and Functional Evidence for a P2X₇ Receptor Signalling Complex." *The EMBO Journal* 20 (22): 6347–58. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.22.6347>.
- Koch-Nolte, Friedrich, Anna Eichhoff, Carolina Pinto-Espinoza, Nicole Schwarz, Tobias Schäfer, Stephan Menzel, Friedrich Haag, Mélanie Demeules, Henri Gondé, and Sahil Adriouch. 2019. *Novel Biologics Targeting the P2X₇ Ion Channel*. *Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.001>.
- Koch-Nolte, Friedrich, and Mathias Ziegler. 2013. "Physiology of ADP-Ribosylation." *The FEBS Journal* 280 (15): 3483. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12389>.
- Krebs, Christian, Sahil Adriouch, Fenja Braasch, Wolfgang Koestner, Edward H. Leiter, Michel Seman, Frances E. Lund, Norman Oppenheimer, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2005. "CD38 Controls ADP-Ribosyltransferase-2-Catalyzed ADP-Ribosylation of T Cell Surface Proteins." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (6): 3298–3305. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.6.3298>.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, and Laurence Zitvogel. 2013. "Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy." *Annual Review of Immunology* 31 (March): 51–72. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032712-100008>.
- Krummey, Scott M., Anna B. Morris, Jessica R. Jacobs, Donald J. McGuire, Satomi Ando, Katherine P. Tong, Weiwen Zhang, et al. 2020. "CD45RB Status of CD8⁺ T Cell Memory Defines T Cell Receptor Affinity and Persistence." *Cell Reports* 30 (5): 1282–1291.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.01.016>.
- Kubick, Christoph, Günther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2011. "The Effect of Anions on the Human P2X₇ Receptor." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (12): 2913–22. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2011.08.017>.
- Kügelgen, Ivar Von, and Kristina Hoffmann. 2016. "Pharmacology and Structure of P2Y Receptors." *Neuropharmacology* 104 (May): 50–61. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.10.030>.
- Künzli, Beat M., Pascal O. Berberat, Thomas Giese, Eva Csizmadia, Elzbieta Kaczmarek, Colin Baker, Irfan Halaceli, Markus W. Büchler, Helmut Friess, and Simon C. Robson. 2007. "Upregulation of CD39/NTPDases and P2 Receptors in Human Pancreatic Disease." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00259.2006>.
- Künzli, Beat M., Maria Isabell Bernlochner, Stephan Rath, Samuel Käser, Eva Csizmadia, Keiichi Enyoji, Peter Cowan, et al. 2011. "Impact of CD39 and Purinergic Signalling on the Growth and Metastasis of Colorectal Cancer." *Purinergic Signalling* 7 (2): 231–41. <https://doi.org/10.1007/S11302-011-9228-9>.
- Kurashima, Yosuke, Takeaki Amiya, Tomonori Nochi, Kumiko Fujisawa, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hiroko Tsutsui, et al. 2012. "Extracellular ATP Mediates Mast Cell-Dependent Intestinal Inflammation through P2X₇ Purinoceptors." *Nature Communications* 2012 3:1 3 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS2023>.
- Kusner, DJ, and JA Barton. 2001. "ATP Stimulates Human Macrophages to Kill Intracellular Virulent

- Mycobacterium Tuberculosis via Calcium-Dependent Phagosome-Lysosome Fusion." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (6): 3308–15. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.6.3308>.
- Lambrecht, Bart N., Matthias Vanderkerken, and Hamida Hammad. 2018. "The Emerging Role of ADAM Metalloproteinases in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 2018 18:12 18 (12): 745–58. <https://doi.org/10.1038/S41577-018-0068-5>.
- Lammas, D. A., C. Stober, C. J. Harvey, N. Kendrick, S. Panchalingam, and D. S. Kumararatne. 1997a. "ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors." *Immunity* 7 (3): 433–44. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80364-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80364-7).
- . 1997b. "ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors." *Immunity* 7 (3): 433–44. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80364-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80364-7).
- Lara, Romain, Elena Adinolfi, Catherine A. Harwood, Mike Philpott, Julian A. Barden, Francesco Di Virgilio, and Shaun McNulty. 2020a. "P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics." *Frontiers in Pharmacology* 11 (June): 793. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00793/BIBTEX>.
- . 2020b. "P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics." *Frontiers in Pharmacology* 11 (June). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00793>.
- . 2020c. *P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. Frontiers in Pharmacology*. Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00793>.
- Latchman, Yvette, Clive R. Wood, Tatyana Chernova, Divya Chaudhary, Madhuri Borde, Irene Chernova, Yoshiko Iwai, et al. 2001. "PD-L2 Is a Second Ligand for PD-1 and Inhibits T Cell Activation." *Nature Immunology* 2 (3): 261–68. <https://doi.org/10.1038/85330>.
- Lazarowski, Eduardo R. 2012. "Vesicular and Conductive Mechanisms of Nucleotide Release." *Purinergic Signalling* 8 (3): 359–73. <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9304-9>.
- Leach, Dana R., Matthew F. Krummel, and James P. Allison. 1996. "Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5256): 1734–36. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.271.5256.1734>.
- Lecciso, Mariangela, Darina Ocadlikova, Sabina Sangaletti, Sara TrabANELLI, Elena De Marchi, Elisa Orioli, Anna Pegoraro, et al. 2017. "ATP Release from Chemotherapy-Treated Dying Leukemia Cells Elicits an Immune Suppressive Effect by Increasing Regulatory T Cells and Tolerogenic Dendritic Cells." *Frontiers in Immunology* 8 (DEC). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01918>.
- Ledent, C, JM Vaugeois, SN Schiffmann, T Pedrazzini, M El Yacoubi, JJ Vanderhaeghen, J Costentin, JK Heath, G Vassart, and Marc Parmentier. 1997. "Aggressiveness, Hypoalgesia and High Blood Pressure in Mice Lacking the Adenosine A2a Receptor." *Nature* 388 (6643): 674–78. <https://doi.org/10.1038/41771>.
- Lemaire, Irma, Simonetta Falzoni, Natacha Leduc, Bin Zhang, Patrizia Pellegatti, Elena Adinolfi, Paola Chiozzi, and Francesco Di Virgilio. 2006. "Involvement of the Purinergic P2X7 Receptor in the Formation of Multinucleated Giant Cells." *The Journal of Immunology* 177 (10): 7257–65. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.10.7257>.
- Lenertz, Lisa Y., Monica L. Gavala, Lindsay M. Hill, and Paul J. Bertics. 2009. "Cell Signaling via the P2X7 Nucleotide Receptor: Linkage to ROS Production, Gene Transcription, and Receptor Trafficking." *Purinergic Signalling* 5 (2): 175–87. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9133-7/FIGURES/8>.
- Lenschow, Deborah J., Yijun Zeng, J. Richard Thistlethwaite, Anthony Montag, William Brady, Marylou G. Gibson, Peter S. Linsley, and Jeffrey A. Bluestone. 1992. "Long-Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by CTLA4lg." *Science (New York, N.Y.)* 257 (5071): 789–92. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1323143>.
- Leone, Robert D., and Jonathan D. Powell. 2020. "Metabolism of Immune Cells in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 2020 20:9 20 (9): 516–31. <https://doi.org/10.1038/S41568-020-0273-Y>.
- Li, Jieyao, Liping Wang, Xinfeng Chen, Lifeng Li, Yu Li, Yu Ping, Lan Huang, et al. 2017. "CD39/CD73 Upregulation on Myeloid-Derived Suppressor Cells via TGF- β -MTOR-HIF-1 Signaling in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncoimmunology* 6 (6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1320011>.
- Li, Ruiting Ruifang, Jing Wang, Ruiting Ruifang Li, Fangfang Zhu, Wenjuan Xu, Gan Zha, Guangzhen He, Huan Cao, Yimin Wang, and Jiong Yang. 2018. "ATP/P2X7-NLRP3 Axis of Dendritic Cells Participates in the Regulation of Airway Inflammation and Hyper-Responsiveness in Asthma by Mediating HMGB1 Expression and Secretion" 366 (1): 1–15. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/29545090/>.
- Li, Xian-Yang, Achim K. Moesta, Christos Xiao, Kyohei Nakamura, Mika Casey, Haiyan Zhang, Jason Madore, et al. 2019. "Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor

- Immunity." *Cancer Discovery*, November. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0541>.
- Li, Zhe, Ben Fillippo Krippendorff, Sharad Sharma, Antje C. Walz, Thierry Lavé, and Dhaval K. Shah. 2016. "Influence of Molecular Size on Tissue Distribution of Antibody Fragments." *MAbs* 8 (1): 113–19. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1111497>.
- Liang, Xin, Damien S. K. Samways, Kyle Wolf, Elizabeth A. Bowles, Jennifer P. Richards, Jonathan Bruno, Sébastien Dutertre, Richard J. DiPaolo, and Terrance M. Egan. 2015. "Quantifying Ca²⁺ Current and Permeability in ATP-Gated P2X7 Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (12): 7930. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.627810>.
- Linden, Joel, Friedrich Koch-Nolte, and Gerhard Dahl. 2019. "Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response." *Annual Review of Immunology* 37 (April): 325–47. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-051116-052406>.
- Linden, R. H.J. Van Der, L. G.J. Frenken, B. De Geus, M. M. Harmsen, R. C. Ruuls, W. Stok, L. De Ron, S. Wilson, P. Davis, and C. T. Verrips. 1999. "Comparison of Physical Chemical Properties of Llama VHH Antibody Fragments and Mouse Monoclonal Antibodies." *Biochimica et Biophysica Acta* 1431 (1): 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00030-8).
- Ling, Chen, Li Zhong, and Arun Srivastava. 2018. "Adeno-Associated Viral Vectors in Gene Therapy." *ELS*, May, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0005738.PUB3>.
- Linsley, Peter S., Philip M. Wallace, Jennifer Johnson, Marylou G. Gibson, Jo Anne L. Greene, Jeffrey A. Ledbetter, Cherry Singh, and Mark A. Tepper. 1992. "Immunosuppression in Vivo by a Soluble Form of the CTLA-4 T Cell Activation Molecule." *Science (New York, N.Y.)* 257 (5071): 792–95. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1496399>.
- Liu, Hong, Yujin Zhang, Hongyu Wu, Angelo D'Alessandro, Gennady G. Yegutkin, Anren Song, Kaiqi Sun, et al. 2016. "Beneficial Role of Erythrocyte Adenosine A2B Receptor-Mediated AMP-Activated Protein Kinase Activation in High-Altitude Hypoxia." *Circulation* 134 (5): 405–21. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021311>.
- Liu, Xing, Zhibin Zhang, Jianbin Ruan, Youdong Pan, Venkat Giri Magupalli, Hao Wu, and Judy Lieberman. 2016. "Inflammasome-Activated Gasdermin D Causes Pyroptosis by Forming Membrane Pores." *Nature* 535:7610 535 (7610): 153–58. <https://doi.org/10.1038/NATURE18629>.
- Liu, Yanhui, Yajuan Xiao, and Zhiyuan Li. 2011. "P2X7 Receptor Positively Regulates MyD88-Dependent NF- κ B Activation." *Cytokine* 55 (2): 229–36. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2011.05.003>.
- Locovei, Silviu, Junjie Wang, and Gerhard Dahl. 2006. "Activation of Pannexin 1 Channels by ATP through P2Y Receptors and by Cytoplasmic Calcium." *FEBS Letters* 580 (1): 239–44. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.12.004>.
- Loertscher, Rolf, and Paula Lavery. 2002. "The Role of Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI)-Anchored Cell Surface Proteins in T-Cell Activation." *Transplant Immunology* 9 (2–4): 93–96. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(02)00013-8).
- Ma, Yuting, Laetitia Aymeric, Clara Locher, Stephen R. Mattarollo, Nicolas F. Delahaye, Pablo Pereira, Laurent Boucontet, et al. 2011. "Contribution of IL-17-Producing Gamma Delta T Cells to the Efficacy of Anticancer Chemotherapy." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (3): 491–503. <https://doi.org/10.1084/JEM.20100269>.
- Mackenzie, Amanda B., S. Wilson, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A, Amanda MacKenzie, et al. 2001. "Rapid Secretion of Interleukin-1 β by Microvesicle Shedding." *Immunity* 15 (5): 825–35. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00229-1).
- Mackenzie, Amanda B., Mark T. Young, Elena Adinolfi, and Annmarie Surprenant. 2005. "Pseudoapoptosis Induced by Brief Activation of ATP-Gated P2X7 Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 33968–76. <https://doi.org/10.1074/JBC.M502705200>.
- Mak, W, Manfred Kopf, Martin F Bachmann, Gabriele Köhler, and Barbara Ecabert. 1999. "Autonomous in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease." *J Immunol References* 163: 1128–31. <http://www.jimmunol.org/content/163/3/http://www.jimmunol.org/content/163/3/1128.full#ref-list-1>.
- Maksimow, Mikael, Lea Kyhälä, Anne Nieminen, Leena Kylänpää, Kristiina Aalto, Kati Elima, Panu Mentula, et al. 2014. "Early Prediction of Persistent Organ Failure by Soluble CD73 in Patients with Acute Pancreatitis*." *Critical Care Medicine* 42 (12): 2556–64. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000550>.
- Mansoor, Steven E., Wei Lü, Wout Oosterheert, Mrinal Shekhar, Emad Tajkhorshid, and Eric Gouaux. 2016. "X-

- Ray Structures Define Human P2X3 Receptor Gating Cycle and Antagonist Action." *Nature* 538 (7623): 66. <https://doi.org/10.1038/NATURE19367>.
- Marchi, Elena De, Elisa Orioli, Diego Dal Ben, and Elena Adinolfi. 2016. "P2X7 Receptor as a Therapeutic Target." *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 104: 39–79. <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2015.11.004>.
- Marchi, Elena De, Elisa Orioli, Anna Pegoraro, Sabina Sangaletti, Paola Portararo, Antonio Curti, Mario Paolo Colombo, Francesco Di Virgilio, and Elena Adinolfi. 2019. "The P2X7 Receptor Modulates Immune Cells Infiltration, Ectonucleotidases Expression and Extracellular ATP Levels in the Tumor Microenvironment." *Oncogene* 38 (19): 3636–50. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0684-y>.
- Mariathasan, S, K Newton, DM Monack, D Vucic, DM French, WP Lee, M Roose-Girma, S Erickson, and VM Dixit. 2004. "Differential Activation of the Inflammasome by Caspase-1 Adaptors ASC and Ipaf." *Nature* 430 (6996): 213–18. <https://doi.org/10.1038/NATURE02664>.
- Markwardt, Fritz, Matthias Löhn, Thomas Böhm, and Manuela Klapperstück. 1997. "Purinoreceptor-Operated Cationic Channels in Human B Lymphocytes." *The Journal of Physiology* 498 (1): 143–51. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1997.SP021847>.
- Martel-Gallegos, G, G Casas-Pruneda, F Ortega-Ortega, S Sánchez-Armass, JA Olivares-Reyes, B Diebold, P Pérez-Cornejo, and J Arreola. 2013. "Oxidative Stress Induced by P2X7 Receptor Stimulation in Murine Macrophages Is Mediated by C-Src/Pyk2 and ERK1/2." *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (10): 4650–59. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.05.023>.
- Martin, Elodie, Majid Amar, Carine Dalle, Ihsen Youssef, Céline Boucher, Caroline Le Duigou, Matthias Brückner, et al. 2018. "New Role of P2X7 Receptor in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Molecular Psychiatry* 2018 24:1 24 (1): 108–25. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0108-3>.
- Martino, Ashley T., Masataka Suzuki, David M. Markusic, Irene Zolotukhin, Renee C. Ryals, Babak Moghimi, Hildegund C.J. Ertl, Daniel A. Muruve, Brendan Lee, and Roland W. Herzog. 2011. "The Genome of Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vectors Increases Toll-like Receptor 9–Dependent Innate Immune Responses in the Liver." *Blood* 117 (24): 6459–68. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-10-314518>.
- Martins, Isabelle, Antoine Tesniere, Oliver Kepp, Mickael Michaud, Frederic Schlemmer, Laura Senovilla, Claire Séror, et al. 2009. "Chemotherapy Induces ATP Release from Tumor Cells." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (22): 3723–28. <https://doi.org/10.4161/CC.8.22.10026>.
- Mascanfroni, Ivan D., Maisa C. Takenaka, Ada Yeste, Bonny Patel, Yan Wu, Jessica E. Kenison, Shafiuddin Siddiqui, et al. 2015. "Metabolic Control of Type 1 Regulatory T Cell Differentiation by AHR and HIF1- α ." *Nature Medicine* 21 (6): 638–46. <https://doi.org/10.1038/NM.3868>.
- Masin, Marianela, Christopher Young, Koini Lim, Sara J. Barnes, Xing Jian Xu, Viola Marschall, Wojciech Brutkowski, et al. 2012. "Expression, Assembly and Function of Novel C-Terminal Truncated Variants of the Mouse P2X7 Receptor: Re-Evaluation of P2X7 Knockouts." *British Journal of Pharmacology* 165 (4): 978–93. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01624.x>.
- Matty, Molly A., Daphne R. Knudsen, Eric M. Walton, Rebecca W. Beerman, Mark R. Cronan, Charlie J. Pyle, Rafael E. Hernandez, and David M. Tobin. 2019. "Potentiation of P2RX7 as a Host-Directed Strategy for Control of Mycobacterial Infection." *ELife* 8 (January). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.39123>.
- Matute, Carlos, Iratxe Torre, Fernando Pérez-Cerdá, Alberto Pérez-Samartín, Elena Alberdi, Estibaliz Etxebarria, Amaia M. Arranz, et al. 2007. "P2X7 Receptor Blockade Prevents ATP Excitotoxicity in Oligodendrocytes and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Neuroscience* 27 (35): 9525–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0579-07.2007>.
- McCarthy, Alanna E., Craig Yoshioka, and Steven E. Mansoor. 2019. "Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Channel Desensitization." *Cell* 179 (3): 659. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.09.017>.
- McCarty, D. M., H. Fu, P. E. Monahan, C. E. Toulson, P. Naik, and R. J. Samulski. 2003. "Adeno-Associated Virus Terminal Repeat (TR) Mutant Generates Self-Complementary Vectors to Overcome the Rate-Limiting Step to Transduction in Vivo." *Gene Therapy* 2003 10:26 10 (26): 2112–18. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302134>.
- McCarty, D. M., P. E. Monahan, and R. J. Samulski. 2001. "Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus (ScaAV) Vectors Promote Efficient Transduction Independently of DNA Synthesis." *Gene Therapy* 8 (16): 1248–54. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301514>.
- McLarnon, James G. 2017. "Roles of Purinergic P2X 7 Receptor in Glioma and Microglia in Brain Tumors." *Cancer Letters* 402 (August): 93–99. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.05.004>.

- McNamara, N, A Khong, D McKemy, M Caterina, J Boyer, D Julius, and C Basbaum. 2001. "ATP Transduces Signals from ASGM1, a Glycolipid That Functions as a Bacterial Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (16): 9086–91. <https://doi.org/10.1073/PNAS.161290898>.
- Mehta, Nisha, Maninder Kaur, Manjinder Singh, Sukhvir Chand, Bhawna Vyas, Pragati Silakari, Malkeet Singh Bahia, and Om Silakari. 2014. "Purinergic Receptor P2X7: A Novel Target for Anti-Inflammatory Therapy." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (1): 54–88. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2013.10.054>.
- Mello, Paola de Andrade, Robson Coutinho-Silva, and Luiz Eduardo Baggio Savio. 2017. "Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives." *Frontiers in Immunology* 8 (NOV). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01526>.
- Metzger, MW, SM Walser, F Aprile-Garcia, N Dedic, A Chen, F Holsboer, E Arzt, W Wurst, and JM Deussing. 2017. "Genetically Dissecting P2rx7 Expression within the Central Nervous System Using Conditional Humanized Mice." *Purinergic Signalling* 13 (2): 153–70. <https://doi.org/10.1007/S11302-016-9546-Z>.
- Michaud, Mickaël, Isabelle Martins, Abdul Qader Sukkurwala, Sandy Adjemian, Yuting Ma, Patrizia Pellegatti, Si Shen, et al. 2011. "Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 334 (6062): 1573–77. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1208347>.
- Mishra, A, Y Guo, L Zhang, S More, T Weng, NR Chintagari, C Huang, et al. 2016. "A Critical Role for P2X7 Receptor-Induced VCAM-1 Shedding and Neutrophil Infiltration during Acute Lung Injury." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197 (7): 2828–37. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1501041>.
- Mittal, Deepak, Matthew M. Gubin, Robert D. Schreiber, and Mark J. Smyth. 2014. "New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases--Elimination, Equilibrium and Escape." *Current Opinion in Immunology* 27 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2014.01.004>.
- Molinier-Frenkel, Valérie, and Flavia Castellano. 2017. "Immunosuppressive Enzymes in the Tumor Microenvironment." *FEBS Letters* 591 (19): 3135–57. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12784>.
- Möller, Sina, Caroline Jung, Sahil Adriouch, Gudrun Dubberke, Fabienne Seyfried, Michel Seman, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2007. "Monitoring the Expression of Purinoceptors and Nucleotide-Metabolizing Ecto-Enzymes with Antibodies Directed against Proteins in Native Conformation." *Purinergic Signalling* 3 (4): 359–66. <https://doi.org/10.1007/S11302-007-9084-9/FIGURES/5>.
- Monif, M, CA Reid, KL Powell, ML Smart, and DA Williams. 2009. "The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (12): 3781–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5512-08.2009>.
- Montalbán del Barrio, Itsaso, Cornelia Penski, Laura Schlahsa, Roland G. Stein, Joachim Diessner, Achim Wöckel, Johannes Dietl, et al. 2016. "Adenosine-Generating Ovarian Cancer Cells Attract Myeloid Cells Which Differentiate into Adenosine-Generating Tumor Associated Macrophages - a Self-Amplifying, CD39- and CD73-Dependent Mechanism for Tumor Immune Escape." *Journal for Immunotherapy of Cancer* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/S40425-016-0154-9>.
- Moon, Hana, Hye Young Na, Kyung Hee Chong, and Tae Jin Kim. 2006. "P2X7 Receptor-Dependent ATP-Induced Shedding of CD27 in Mouse Lymphocytes." *Immunology Letters* 102 (1): 98–105. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2005.08.004>.
- Moore, Samantha F., and Amanda B. MacKenzie. 2009. "NADPH Oxidase NOX2 Mediates Rapid Cellular Oxidation Following ATP Stimulation of Endotoxin-Primed Macrophages." *The Journal of Immunology* 183 (5): 3302–8. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900394>.
- Mowers, Erin E., Marina N. Sharifi, and Kay F. Macleod. 2018. "Functions of Autophagy in the Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis." *The FEBS Journal* 285 (10): 1751–66. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14388>.
- Muller, Christa. 2015. "Medicinal Chemistry of P2X Receptors: Allosteric Modulators." *Current Medicinal Chemistry* 22 (7): 929–41. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141210155610>.
- Munn, David H., and Vincenzo Bronte. 2016. "Immune Suppressive Mechanisms in the Tumor Microenvironment." *Current Opinion in Immunology* 39 (April): 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2015.10.009>.
- Murrell-Lagnado, RD. 2017. "Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol." *Current Topics in Membranes* 80: 211–32. <https://doi.org/10.1016/BS.CTM.2017.05.004>.
- Mutini, C, S Falzoni, D Ferrari, P Chiozzi, A Morelli, O R Baricordi, G Collo, P Ricciardi-Castagnoli, and F Di

- Virgilio. 1999. "Mouse Dendritic Cells Express the P2X7 Purinergic Receptor: Characterization and Possible Participation in Antigen Presentation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (4): 1958–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438932>.
- Muyldermans, Serge. 2013. "Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies." *Annual Review of Biochemistry* 82 (1): 775–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- Naito, Yoshitsugu, and John M. Lowenstein. 2002. "5'-Nucleotidase from Rat Heart." *Biochemistry* 20 (18): 5188–94. <https://doi.org/10.1021/BI00521A014>.
- Nelson, Derek W., Robert J. Gregg, Michael E. Kort, Arturo Perez-Medrano, Eric A. Voight, Ying Wang, George Grayson, et al. 2006. "Structure-Activity Relationship Studies on a Series of Novel, Substituted 1-Benzyl-5-Phenyltetrazole P2X7 Antagonists." *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (12): 3659–66. https://doi.org/10.1021/JM051202E/SUPPL_FILE/JM051202ESI20060403_114853.PDF.
- Neo, Shi Yong, Ying Yang, Record Julien, Ran Ma, Xinsong Chen, Ziqing Chen, Nicholas P. Tobin, et al. 2019. "CD73 Immune Checkpoint Defines Regulatory NK-Cells within the Tumor Microenvironment." *Journal of Clinical Investigation*, November. <https://doi.org/10.1172/JCI128895>.
- Neves, Adriane R., Morgana T.L. Castelo-Branco, Vanessa R. Figliuolo, Claudio Bernardazzi, Fernanda Buongusto, Agnes Yoshimoto, Hayandra F. Nanini, et al. 2014. "Overexpression of ATP-Activated P2X7 Receptors in the Intestinal Mucosa Is Implicated in the Pathogenesis of Crohn's Disease." *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (3): 444–57. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441201.10454.06>.
- Nicke, Annette. 2008. "Homotrimeric Complexes Are the Dominant Assembly State of Native P2X7 Subunits." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377 (3): 803–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.042>.
- Nicke, Annette, Yung-Hui Hui Kuan, Marianela Masin, Jürgen Rettinger, Benjamin Marquez-Klaka, Olaf Bender, Dariusz C. Górecki, Ruth D. Murrell-Lagnado, and Florentina Soto. 2009. "A Functional P2X7 Splice Variant with an Alternative Transmembrane Domain 1 Escapes Gene Inactivation in P2X7 Knock-out Mice." *Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 25813–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.033134>.
- Nishimura, Hiroyuki, Masato Nose, Hiroshi Hiai, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo. 1999. "Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor." *Immunity* 11 (2): 141–51. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8).
- Noguchi, Takuya, Ken Ishii, Hisashi Fukutomi, Isao Naguro, Atsushi Matsuzawa, Kohsuke Takeda, and Hidenori Ichijo. 2008. "Requirement of Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of ASK1-P38 MAPK Pathway for Extracellular ATP-Induced Apoptosis in Macrophage." *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7657–65. <https://doi.org/10.1074/JBC.M708402200>.
- Nörenberg, W., H. Sobottka, C. Hempel, T. Plötz, W. Fischer, G. Schmalzing, and M. Schaefer. 2012. "Positive Allosteric Modulation by Ivermectin of Human but Not Murine P2X7 Receptors." *British Journal of Pharmacology* 167 (1): 48–66. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.01987.X>.
- Nörenberg, Wolfgang, Christoph Hempel, Nicole Urban, Helga Sobottka, Peter Illes, and Michael Schaefer. 2011. "Clemastine Potentiates the Human P2X7 Receptor by Sensitizing It to Lower ATP Concentrations." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (13): 11067–81. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.198879>.
- North, R. Alan. 2002. "Molecular Physiology of P2X Receptors." <https://doi.org/10.1152/Physrev.00015.2002> 82 (4): 1013–67. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2002>.
- North, R. Alan, and Michael F. Jarvis. 2013. "P2X Receptors as Drug Targets." *Molecular Pharmacology* 83 (4): 759–69. <https://doi.org/10.1124/MOL.112.083758>.
- North, R. Alan, and Annmarie Surprenant. 2003. "Pharmacology of Cloned P2X Receptors." <http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1146/Annurev.Pharmtox.40.1.563> 40 (November): 563–80. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.40.1.563>.
- North, R. A. 2002. "Molecular Physiology of P2X Receptors." *Physiological Reviews* 82 (4): 1013–67. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2002>.
- Nunes-Xavier, Caroline E., Javier C. Angulo, Rafael Pulido, and José I. López. 2019. "A Critical Insight into the Clinical Translation of PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma." *Current Urology Reports* 20 (1). <https://doi.org/10.1007/S11934-019-0866-8>.
- Ohaegbulam, Kim C., Amer Assal, Eszter Lazar-Molnar, Yu Yao, and Xingxing Zang. 2015. "Human Cancer Immunotherapy with Antibodies to the PD-1 and PD-L1 Pathway." *Trends in Molecular Medicine* 21 (1): 24. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2014.10.009>.
- Ohshima, Yasuhiro, Mitsutoshi Tsukimoto, Takato Takenouchi, Hitoshi Harada, Akina Suzuki, Mitsuru Sato, Hiroshi Kitani, and Shuji Kojima. 2010. "Gamma-Irradiation Induces P2X(7) Receptor-Dependent ATP

- Release from B16 Melanoma Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1800 (1): 40–46.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2009.10.008>.
- Ohta, A., and M. Sitkovsky. 2001. "Role of G-Protein-Coupled Adenosine Receptors in Downregulation of Inflammation and Protection from Tissue Damage." *Nature* 414 (6866): 916–20.
<https://doi.org/10.1038/414916A>.
- Ohta, Akio, Elieser Gorelik, Simon J. Prasad, Franca Ronchese, Dmitriy Lukashov, Michael K.K. Wong, Xiaojun Huang, et al. 2006. "A2A Adenosine Receptor Protects Tumors from Antitumor T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 13132–37.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0605251103>.
- Orioli, Elisa, Elena De Marchi, Anna Lisa Giuliani, and Elena Adinolfi. 2017. "P2X7 Receptor Orchestrates Multiple Signalling Pathways Triggering Inflammation, Autophagy and Metabolic/Trophic Responses." *Current Medicinal Chemistry* 24 (21). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170303161659>.
- Ousingsawat, J, P Wanitchakool, A Kmit, AM Romao, W Jantarajit, R Schreiber, and K Kunzelmann. 2015. "Anoctamin 6 Mediates Effects Essential for Innate Immunity Downstream of P2X7 Receptors in Macrophages." *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS7245>.
- Oviedo-Orta, Ernesto, and W. Howard Evans. 2004. "Gap Junctions and Connexin-Mediated Communication in the Immune System." *Biochimica et Biophysica Acta* 1662 (1–2): 102–12.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2003.10.021>.
- Pagès, Franck, Anne Berger, Matthieu Camus, Fatima Sanchez-Cabo, Anne Costes, Robert Molitor, Bernhard Mlecnik, et al. 2005. "Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 353 (25): 2654–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA051424>.
- Paluch, Ewa K., and Erez Raz. 2013. "The Role and Regulation of Blebs in Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 582–90. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2013.05.005>.
- Pardoll, Drew M. 2012. "The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Cancer* 12:4 12 (4): 252–64. <https://doi.org/10.1038/NRC3239>.
- Parsa, Andrew T., James S. Waldron, Amith Panner, Courtney A. Crane, Ian F. Parney, Jeffrey J. Barry, Kristine E. Cachola, et al. 2007. "Loss of Tumor Suppressor PTEN Function Increases B7-H1 Expression and Immuno-resistance in Glioma." *Nature Medicine* 13 (1): 84–88. <https://doi.org/10.1038/NM1517>.
- Pegoraro, Anna, Elena De Marchi, Manuela Ferracin, Elisa Orioli, Michele Zanoni, Cristian Bassi, Anna Tesei, et al. 2021. "P2X7 Promotes Metastatic Spreading and Triggers Release of miRNA-Containing Exosomes and Microvesicles from Melanoma Cells." *Cell Death & Disease* 12 (12). <https://doi.org/10.1038/S41419-021-04378-0>.
- Pelegri, Pablo, and A. Surprenant. 2006. "Pannexin-1 Mediates Large Pore Formation and Interleukin-1 β Release by the ATP-Gated P2X7 Receptor." *The EMBO Journal* 25 (21): 5071–82.
<https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601378>.
- Pellegatti, Patrizia, Lizzia Raffaghello, Giovanna Bianchi, Federica Piccardi, Vito Pistoia, Francesco Di Virgilio, and Francesco Di Virgilio. 2008. "Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase." *PLoS ONE* 3 (7): 3856–64. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>.
- Pérez-Flores, Gabriela, Sébastien A. Lévesque, Jonathan Pacheco, Luis Vaca, Steve Lacroix, Patricia Pérez-Cornejo, and Jorge Arreola. 2015. "The P2X7/P2X4 Interaction Shapes the Purinergic Response in Murine Macrophages." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (3): 484–90.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.10.025>.
- Perregaux, David G., Pat McNiff, Ron Laliberte, Maryrose Conklyn, and Christopher A. Gabel. 2000. "ATP Acts as an Agonist to Promote Stimulus-Induced Secretion of IL-1 β and IL-18 in Human Blood." *The Journal of Immunology* 165 (8): 4615–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4615>.
- Peverini, Laurie, Juline Beudez, Kate Dunning, Thierry Chataigneau, and Thomas Grutter. 2018. "New Insights Into Permeation of Large Cations Through ATP-Gated P2X Receptors." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 265. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00265>.
- Pfeiffer, Zachary A., Alma N. Guerra, Lindsay M. Hill, Monica L. Gavala, Usha Prabhu, Mini Aga, David J. Hall, and Paul J. Bertics. 2007. "Nucleotide Receptor Signaling in Murine Macrophages Is Linked to Reactive Oxygen Species Generation." *Free Radical Biology & Medicine* 42 (10): 1506–16.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2007.02.010>.
- Piccini, A, S Carta, S Tassi, D Lasiglié, G Fossati, and A Rubartelli. 2008. "ATP Is Released by Monocytes Stimulated with Pathogen-Sensing Receptor Ligands and Induces IL-1 β and IL-18 Secretion in an Autocrine Way." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105

- (23): 8067–72. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0709684105>.
- Pietrocola, Federico, José Manuel Bravo-San Pedro, Lorenzo Galluzzi, and Guido Kroemer. 2017. "Autophagy in Natural and Therapy-Driven Anticancer Immunosurveillance." *Autophagy* 13 (12): 2163–70. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1310356>.
- Pippel, Anja, Michaela Stolz, Ronja Woltersdorf, Achim Kless, Gönther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2017. "Localization of the Gate and Selectivity Filter of the Full-Length P2X7 Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (11): E2156–65. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1610414114>.
- Pizzirani, Cinzia, Davide Ferrari, Paola Chiozzi, Elena Adinolfi, Dorianna Sandonà, Erika Savaglio, Francesco Di Virgilio, et al. 2007. "Stimulation of P2 Receptors Causes Release of IL-1 β -Loaded Microvesicles from Human Dendritic Cells." *Blood* 109 (9): 3856–64. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-06-031377>.
- Poulsen, Sally Ann, and Ronald J. Quinn. 1998. "Adenosine Receptors: New Opportunities for Future Drugs." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6 (6): 619–41. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00038-8).
- Proietti, M, V Cornacchione, T Rezzonico Jost, A Romagnani, CE Faliti, L Perruzza, R Rigoni, et al. 2014. "ATP-Gated Ionotropic P2X7 Receptor Controls Follicular T Helper Cell Numbers in Peyer's Patches to Promote Host-Microbiota Mutualism." *Immunity* 41 (5): 789–801. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.10.010>.
- Proietti, Michele, Lisa Perruzza, Daniela Scribano, Giovanni Pellegrini, Rocco D'Antuono, Francesco Strati, Marco Raffaelli, et al. 2019. "ATP Released by Intestinal Bacteria Limits the Generation of Protective IgA against Enteropathogens." *Nature Communications* 2019 10:1 10 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/S41467-018-08156-Z>.
- Pulte, Dianne, Richard R. Furman, M. Johan Broekman, Joan H.F. Drosopoulos, Harold S. Ballard, Kim E. Olson, Jorge R. Kizer, and Aaron J. Marcus. 2011. "CD39 Expression on T Lymphocytes Correlates With Severity of Disease in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia." *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 11 (4): 367–72. <https://doi.org/10.1016/J.CLML.2011.06.005>.
- Pupovac, A, CM Foster, and R. Sluyter. 2013. "Human P2X7 Receptor Activation Induces the Rapid Shedding of CXCL16." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432 (4): 626–31. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.01.134>.
- Pupovac, A, NJ Geraghty, D Watson, and R Sluyter. 2015. "Activation of the P2X7 Receptor Induces the Rapid Shedding of CD23 from Human and Murine B Cells." *Immunology and Cell Biology* 93 (1): 77–85. <https://doi.org/10.1038/ICB.2014.69>.
- Qian, Yanrong, Xuan Wang, Yi Liu, Yunsheng Li, Robert A. Colvin, Lingying Tong, Shiyong Wu, and Xiaozhuo Chen. 2014. "Extracellular ATP Is Internalized by Macropinocytosis and Induces Intracellular ATP Increase and Drug Resistance in Cancer Cells." *Cancer Letters* 351 (2): 242–51. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2014.06.008>.
- Qin, Juliang, Xiaoyu Zhang, Binghe Tan, Su Zhang, Chengcong Yin, Qi Xue, Zhen Zhang, et al. 2020. "Blocking P2X7-Mediated Macrophage Polarization Overcomes Treatment Resistance in Lung Cancer." *Cancer Immunology Research* 6: canimm.0123.2020. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-20-0123>.
- Qiu, Feng, and Gerhard Dahl. 2009. "A Permeant Regulating Its Permeation Pore: Inhibition of Pannexin 1 Channels by ATP." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 296 (2). <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00433.2008>.
- Qiu, Ying, Wei Hua Li, Hong Quan Zhang, Yan Liu, Xin Xia Tian, and Wei Gang Fang. 2014. "P2X7 Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells." *PLOS ONE* 9 (12): e114371. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114371>.
- Qu, Yan, and George R. Dubyak. 2009. "P2X7 Receptors Regulate Multiple Types of Membrane Trafficking Responses and Non-Classical Secretion Pathways." *Purinergic Signalling* 2009 5:2 5 (2): 163–73. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9132-8>.
- Qureshi, Omar S., Yong Zheng, Kyoko Nakamura, Kesley Attridge, Claire Manzotti, Emily M. Schmidt, Jennifer Baker, et al. 2011. "Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell Extrinsic Function of CTLA-4." *Science (New York, N.Y.)* 332 (6029): 600. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1202947>.
- Rabinowitz, Joseph E., Fabienne Rolling, Chengwen Li, Hervé Conrath, Weidong Xiao, Xiao Xiao, and R. Jude Samulski. 2002. "Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity." *Journal of Virology* 76 (2): 791–801. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.791-801.2002>.
- Raffaghello, Lizzia, Paola Chiozzi, Simonetta Falzoni, Francesco Di Virgilio, and Vito Pistoia. 2006. "The P2X7 Receptor Sustains the Growth of Human Neuroblastoma Cells through a Substance P-Dependent

- Mechanism." *Cancer Research* 66 (2): 907–14. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3185>.
- Ramos-Casals, Manuel, Julie R. Brahmer, Margaret K. Callahan, Alejandra Flores-Chávez, Niamh Keegan, Munther A. Khamashta, Olivier Lambotte, Xavier Mariette, Aleix Prat, and Maria E. Suárez-Almazor. 2020. "Immune-Related Adverse Events of Checkpoint Inhibitors." *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1 6 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1038/S41572-020-0160-6>.
- Rashidian, Mohammad, Martin W. LaFleur, Vincent L. Verschoor, Anushka Dongre, Yun Zhang, Thao H. Nguyen, Stephen Kolifrath, et al. 2019. "Immuno-PET Identifies the Myeloid Compartment as a Key Contributor to the Outcome of the Antitumor Response under PD-1 Blockade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (34): 16971–80. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1905005116>.
- Reichenbach, Nicole, Andrea Delekate, Björn Breithausen, Kevin Keppler, Stefanie Poll, Theresa Schulte, Jan Peter, et al. 2018. "P2Y1 Receptor Blockade Normalizes Network Dysfunction and Cognition in an Alzheimer's Disease Model." *Journal of Experimental Medicine* 215 (6): 1649–63. <https://doi.org/10.1084/JEM.20171487/VIDEO-1>.
- Riedel, T., G. Schmalzing, and F. Markwardt. 2007. "Influence of Extracellular Monovalent Cations on Pore and Gating Properties of P2X7 Receptor-Operated Single-Channel Currents." *Biophysical Journal* 93 (3): 846–58. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.103614>.
- Rissiek, Björn, Friedrich Haag, Olivier Boyer, Friedrich Koch-Nolte, and Sahil Adriouch. 2015. "P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00204>.
- Rissiek, Björn, Marco Lukowiak, Friederike Raczkowski, Tim Magnus, Hans Willi Mittrücker, and Friedrich Koch-Nolte. 2018. "In Vivo Blockade of Murine ARTC2.2 during Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells." *Frontiers in Immunology* 9 (JUL): 1580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01580>.
- Robles, René J., Samiran Mukherjee, Marta Vuerich, Anyan Xie, Rasika Harshe, Peter J. Cowan, Eva Csizmadia, et al. 2020. "Modulation of CD39 and Exogenous APT102 Correct Immune Dysfunction in Experimental Colitis and Crohn's Disease." *Journal of Crohn's & Colitis* 14 (6): 818–30. <https://doi.org/10.1093/ECCO-JCC/JJZ182>.
- Roger, S, ZZ Mei, JM Baldwin, L Dong, H Bradley, SA Baldwin, A Surprenant, and LH Jiang. 2010. "Single Nucleotide Polymorphisms That Were Identified in Affective Mood Disorders Affect ATP-Activated P2X7 Receptor Functions." *Journal of Psychiatric Research* 44 (6): 347–55. <https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHIRES.2009.10.005>.
- Roger, Sébastien, Pablo Pelegrin, and Annmarie Surprenant. 2008. "Facilitation of P2X7 Receptor Currents and Membrane Blebbing via Constitutive and Dynamic Calmodulin Binding." *Journal of Neuroscience* 28 (25): 6393–6401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0696-08.2008>.
- Romagnani, Andrea, Elsa Rottoli, Emilia Maria Cristina Mazza, Tanja Rezzonico-Jost, Benedetta De Ponte Conti, Michele Proietti, Michela Perotti, et al. 2020. "P2X7 Receptor Activity Limits Accumulation of T Cells within Tumors." *Cancer Research*, canres.3807.2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-19-3807>.
- Roo, Mathias De, Jean Luc Rodeau, and Rémy Schlichter. 2003. "Dehydroepiandrosterone Potentiates Native Ionotropic ATP Receptors Containing the P2X2 Subunit in Rat Sensory Neurons." *The Journal of Physiology* 552 (1): 59–71. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2003.046078>.
- Ruan, Zhi, Jean Christophe Delpech, Srinidhi Venkatesan Kalavai, Alicia A. Van Enoo, Jianqiao Hu, Seiko Ikezu, and Tsuneya Ikezu. 2020. "P2RX7 Inhibitor Suppresses Exosome Secretion and Disease Phenotype in P301S Tau Transgenic Mice." *Molecular Neurodegeneration* 15 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13024-020-00396-2/FIGURES/6>.
- Rudd, Christopher E. 2008. "The Reverse Stop-Signal Model for CTLA4 Function." *Nature Reviews. Immunology* 8 (2): 153–60. <https://doi.org/10.1038/NRI2253>.
- Ryzhov, Sergey V., Michael W. Pickup, Anna Chytil, Agnieszka E. Gorska, Qinkun Zhang, Philip Owens, Igor Feoktistov, Harold L. Moses, and Sergey V. Novitskiy. 2014. "Role of TGF- β Signaling in Generation of CD39+CD73+ Myeloid Cells in Tumors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (6): 3155–64. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400578>.
- Saber, Sameh, Mahmoud E. Youssef, Hossam Sharaf, Noha A. Amin, Ruwyda El-Shedody, Farah H. Aboutouk, Yumna Abd El-Galeel, et al. 2021. "BBG Enhances OLT1177-Induced NLRP3 Inflammasome Inactivation by Targeting P2X7R/NLRP3 and MyD88/NF-KB Signaling in DSS-Induced Colitis in Rats." *Life Sciences* 270 (April). <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119123>.
- Sadej, Rafal, Kunihiro Inai, Zenon Rajfur, Anna Ostapkowicz, Jon Kohler, Andrzej C. Skladanowski, Beverly S. Mitchell, and Jozef Spychala. 2008. "Tenascin C Interacts with Ecto-5'-Nucleotidase (EN) and Regulates

- Adenosine Generation in Cancer Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (1): 35–40.
<https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2007.11.001>.
- Saéz, Pablo J., Pablo Vargas, Kenji F. Shoji, Paloma A. Harcha, Ana Mariá Lennon-Duméni, and Juan C. Saéz. 2017. "ATP Promotes the Fast Migration of Dendritic Cells through the Activity of Pannexin 1 Channels and P2X7 Receptors." *Science Signaling* 10 (506). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7107>.
- Sala, Andrea la, Davide Ferrari, Silvia Corinti, Andrea Cavani, Francesco Di Virgilio, and Giampiero Girolomoni. 2001. "Extracellular ATP Induces a Distorted Maturation of Dendritic Cells and Inhibits Their Capacity to Initiate Th1 Responses." *The Journal of Immunology* 166 (3): 1611–17.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.3.1611>.
- Sala, Andrea La, Silvia Sebastiani, Davide Ferrari, Francesco Di Virgilio, Marco Idzko, Johannes Norgauer, and Giampiero Girolomoni. 2002. "Dendritic Cells Exposed to Extracellular Adenosine Triphosphate Acquire the Migratory Properties of Mature Cells and Show a Reduced Capacity to Attract Type 1 T Lymphocytes." *Blood* 99 (5): 1715–22. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.5.1715>.
- Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein, and L. A. Hunter. 1991. "Targeted Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) into Human Chromosome 19." *The EMBO Journal* 10 (12): 3941. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04964.x>.
- Sánchez-Nogueiro, J, P Marín-García, and MT Miras-Portugal. 2005. "Characterization of a Functional P2X(7)-like Receptor in Cerebellar Granule Neurons from P2X(7) Knockout Mice." *FEBS Letters* 579 (17): 3783–88. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.05.073>.
- Sanz, Juana M., Paola Chiozzi, and Francesco Di Virgilio. 1998. "Tenidap Enhances P2Z/P2X7 Receptor Signalling in Macrophages." *European Journal of Pharmacology* 355 (2–3): 235–44. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00482-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00482-8).
- Sanz, and Di Virgilio. 2000. "Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 Beta Release from Microglial Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (9): 4893–98.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.9.4893>.
- Saunders, Kevin O., Lingshu Wang, M. Gordon Joyce, Zhi-Yong Yang, Alejandro B. Balazs, Cheng Cheng, Sung-Youl Ko, et al. 2015. "Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection." *Journal of Virology* 89 (16): 8334–45. <https://doi.org/10.1128/jvi.00908-15>.
- Schenk, U, M Frascoli, M Proietti, R Geffers, E Traggiai, J Buer, C Ricordi, AM Westendorf, and F Grassi. 2011. "ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells through the Activation of Purinergic P2X Receptors." *Science Signaling* 4 (162). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2001270>.
- Schenk, Ursula, Astrid M. Westendorf, Enrico Radaelli, Anna Casati, Micol Ferro, Marta Fumagalli, Claudia Verderio, Jan Buer, Eugenio Scanziani, and Fabio Grassi. 2008. "Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released through Pannexin-1 Hemichannels." *Science Signaling* 1 (39).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.1160583>.
- Scheuplein, Felix, Nicole Schwarz, Sahil Adriouch, Christian Krebs, Peter Bannas, Björn Rissiek, Michel Seman, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2009. "NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells." *The Journal of Immunology* 182 (5): 2898–2908. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0801711>.
- Schmid, Severin, Markus Kübler, C. Korcan Ayata, Zsofia Lazar, Benedikt Haager, Madelon Hoßfeld, Anja Meyer, et al. 2015. "Altered Purinergic Signaling in the Tumor Associated Immunologic Microenvironment in Metastasized Non-Small-Cell Lung Cancer." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 90 (3): 516–21.
<https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2015.10.005>.
- Schneider, Enja, Anne Rissiek, Riekje Winzer, Berta Puig, Björn Rissiek, Friedrich Haag, Hans-Willi Mittrücker, Tim Magnus, and Eva Tolosa. 2019. "Generation and Function of Non-Cell-Bound CD73 in Inflammation." *Frontiers in Immunology* 10 (July): 1729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01729>.
- Schnurr, Max, Tracey Toy, Amanda Shin, Moritz Wagner, Jonathan Cebon, and Eugene Maraskovsky. 2005. "Extracellular Nucleotide Signaling by P2 Receptors Inhibits IL-12 and Enhances IL-23 Expression in Human Dendritic Cells: A Novel Role for the CAMP Pathway." *Blood* 105 (4): 1582–89.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-05-1718>.
- Schumacher, Dagmar, Boris Strilic, Kishor Kumar Sivaraj, Nina Wettschureck, and Stefan Offermanns. 2013. "Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor." *Cancer Cell* 24 (1): 130–37. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.05.008>.
- Schwarz, Nicole, Laurent Drouot, Annette Nicke, Ralf Fliegert, Olivier Boyer, Andreas H. Guse, Friedrich Haag, Sahil Adriouch, and Friedrich Koch-Nolte. 2012. "Alternative Splicing of the N-Terminal Cytosolic and

- Transmembrane Domains of P2X7 Controls Gating of the Ion Channel by ADP-Ribosylation." *PLOS ONE* 7 (7): e41269. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041269>.
- Schwarz, Nicole, Ralf Fliegert, Sahil Adriouch, Michel Seman, Andreas H. Guse, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2009. "Activation of the P2X7 Ion Channel by Soluble and Covalently Bound Ligands." *Purinergic Signalling* 2009 5:2 5 (2): 139–49. <https://doi.org/10.1007/S11302-009-9135-5>.
- Seman, Michel, Sahil Adriouch, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2004. "Ecto-ADP-Ribosyltransferases (ARTs): Emerging Actors in Cell Communication and Signaling." *Current Medicinal Chemistry* 11 (7): 857–72. <https://doi.org/10.2174/0929867043455611>.
- Seman, Michel, Sahil Adriouch, Felix Scheuplein, Christian Krebs, Dunja Freese, Gustavo Glowacki, Phillipe Deterre, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2003. "NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor." *Immunity* 19 (4): 571–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00266-8).
- Sengstake, Sarah, Eva-Maria Boneberg, and Harald Illges. 2006. "CD21 and CD62L Shedding Are Both Inducible via P2X7Rs." *International Immunology* 18 (7): 1171–78. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXL051>.
- Sharp, Anthony J., Paul E. Polak, Vittoria Simonini, Shao X. Lin, Jill C. Richardson, Ernesto R. Bongarzone, and Douglas L. Feinstein. 2008. "P2x7 Deficiency Suppresses Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Neuroinflammation* 5: 33. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-33>.
- Sharpe, Arlene H., E. John Wherry, Rafi Ahmed, and Gordon J. Freeman. 2007. "The Function of Programmed Cell Death 1 and Its Ligands in Regulating Autoimmunity and Infection." *Nature Immunology* 8 (3): 239–45. <https://doi.org/10.1038/NI1443>.
- Shen, Li, Anette Sundstedt, Michael Ciesielski, Kiersten Marie Miles, Mona Celander, Remi Adelaiye, Ashley Orillion, et al. 2015. "Tasquinimod Modulates Suppressive Myeloid Cells and Enhances Cancer Immunotherapies in Murine Models." *Cancer Immunology Research* 3 (2): 136–48. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0036>.
- Shi, H, Y Wang, X Li, X Zhan, M Tang, M Fina, L Su, et al. 2016. "NLRP3 Activation and Mitosis Are Mutually Exclusive Events Coordinated by NEK7, a New Inflammasome Component." *Nature Immunology* 17 (3): 250–58. <https://doi.org/10.1038/NI.3333>.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang, Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang, and Feng Shao. 2015. "Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death." *Nature* 2015 526:7575 526 (7575): 660–65. <https://doi.org/10.1038/NATURE15514>.
- Sim, Joan A., Mark T. Young, Hye Youn Sung, R. Alan North, and Annmarie Surprenant. 2004. "Reanalysis of P2X7 Receptor Expression in Rodent Brain." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (28): 6307–14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-04.2004>.
- Sitkovsky, Michail V., Stephen Hatfield, Robert Abbott, Bryan Belikoff, Dmitriy Lukashev, and Akio Ohta. 2014. "Hostile, Hypoxia-A2-Adenosinergic Tumor Biology as the next Barrier to Overcome for Tumor Immunologists." *Cancer Immunology Research* 2 (7): 598–605. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0075>.
- Sluyter, Ronald. 2015. "P2X and P2Y Receptor Signaling in Red Blood Cells." *Frontiers in Molecular Biosciences* 2 (OCT). <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2015.00060>.
- Smart, Megan L., Ben Gu, Rekha G. Panchal, James Wiley, Brett Cromer, David A. Williams, and Steven Petrou. 2003. "P2X7 Receptor Cell Surface Expression and Cytolytic Pore Formation Are Regulated by a Distal C-Terminal Region." *Journal of Biological Chemistry* 278 (10). <https://doi.org/10.1074/jbc.M211094200>.
- Soares-Bezerra, Rômulo J., Rosa T. Pinho, Rodrigo Da C. Bisaggio, Thereza Christina Benévolo-De-Andrade, and Luiz A. Alves. 2015. "The Search for New Agonists to P2X7R for Clinical Use: Tuberculosis as a Possible Target." *Cellular Physiology and Biochemistry* 37 (2): 409–18. <https://doi.org/10.1159/000430364>.
- Solini, Anna, and Ivana Novak. 2019. "Role of the P2X7 Receptor in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes and Its Microvascular Complications." *Current Opinion in Pharmacology* 47 (August): 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2019.02.009>.
- Solini, Anna, Chiara Rossi, Eleonora Santini, Martina Giuntini, Francesco Raggi, Federico Parolini, Edoardo Biancalana, Eleonora Del Prete, Ubaldo Bonuccelli, and Roberto Ceravolo. 2021. "P2X7 Receptor/NLRP3 Inflammasome Complex and α -Synuclein in Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Prospective Study in Neo-Diagnosed, Treatment-Naïve Parkinson's Disease." *European Journal of Neurology* 28 (8): 2648–56. <https://doi.org/10.1111/ENE.14918>.
- Solle, Mike, Jeff Labasi, David G. Perregaux, Ethan Stam, Nina Petrushova, Beverly H. Koller, Richard J. Griffiths, and Christopher A. Gabel. 2001. "Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors." *Journal*

- of *Biological Chemistry* 276 (1): 125–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>.
- Sommer, Anselm, Felix Kordowski, Joscha Büch, Thorsten Maretzky, Astrid Evers, Jrg Andrä, Stefan Düsterhöft, et al. 2016. "Phosphatidylserine Exposure Is Required for ADAM17 Sheddase Function." *Nature Communications* 7 (May): 11523. <https://doi.org/10.1038/ncomms11523>.
- Soond, SM, B Everson, DW Riches, and G Murphy. 2005. "ERK-Mediated Phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-Converting Enzyme and Its Potential Role in TACE Protein Trafficking." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 11): 2371–80. <https://doi.org/10.1242/JCS.02357>.
- Stagg, John, Paul A. Beavis, Upulie Divisekera, Mira C.P. Liu, Andreas Möller, Phillip K. Darcy, and Mark J. Smyth. 2012. "CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis." *Cancer Research* 72 (9): 2190–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0420>.
- Stagg, John, Upulie Divisekera, Helene Duret, Tim Sparwasser, Michele W.L. Teng, Phillip K. Darcy, and Mark J. Smyth. 2011. "CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis." *Cancer Research* 71 (8): 2892–2900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4246>.
- Stagg, John, Upulie Divisekera, Nicole McLaughlin, Janelle Sharkey, Sandra Pommey, Delphine Denoyer, Karen M. Dwyer, and Mark J. Smyth. 2010. "Anti-CD73 Antibody Therapy Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4): 1547–52. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0908801107>.
- Stark, Regina, Thomas H. Wesselink, Felix M. Behr, Natasja A.M. M. Kragten, Ramon Arens, Friedrich Koch-Nolte, Klaas P.J.M. van Gisbergen, René A.W. van Lier, Klaas P. J. M. van Gisbergen, and René A. W. van Lier. 2018. "TRM Maintenance Is Regulated by Tissue Damage via P2RX7." *Science Immunology* 3 (30). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau1022>.
- Staron, Matthew M., Simon M. Gray, Heather D. Marshall, Ian A. Parish, Jonathan H. Chen, Curtis J. Perry, Guoliang Cui, Ming O. Li, and Susan M. Kaech. 2014. "The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8+ T Cells during Chronic Infection." *Immunity* 41 (5): 802. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.10.013>.
- Stock, Thomas C., Bradley J. Bloom, Nathan Wei, Saliha Ishaq, Won Park, Xin Wang, Pankaj Gupta, and Charles A. Mebus. 2012. "Efficacy and Safety of CE-224,535, an Antagonist of P2X7 Receptor, in Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis Inadequately Controlled by Methotrexate." *The Journal of Rheumatology* 39 (4): 720–27. <https://doi.org/10.3899/JRHEUM.110874>.
- Stokes, Leanne, Stefan Bidula, Lučka Bibič, and Elizabeth Allum. 2020. "To Inhibit or Enhance? Is There a Benefit to Positive Allosteric Modulation of P2X Receptors?" *Frontiers in Pharmacology* 0 (May): 627. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00627>.
- Stokes, Leanne, Stephen J. Fuller, Ronald Sluyter, Kristen K. Skarratt, Ben J. Gu, and James S. Wiley. 2010. "Two Haplotypes of the P2X7 Receptor Containing the Ala-348 to Thr Polymorphism Exhibit a Gain-of-Function Effect and Enhanced Interleukin-1 β Secretion." *The FASEB Journal* 24 (8): 2916–27. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-150862>.
- Sun, Daqing, Linda C. Samuelson, Tianxin Yang, Yuning Huang, Alex Paliege, Thom Saunders, Josie Briggs, and Jurgen Schnermann. 2001. "Mediation of Tubuloglomerular Feedback by Adenosine: Evidence from Mice Lacking Adenosine 1 Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9983–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.171317998>.
- Sun, Xiaofeng, Yan Wu, Wenda Gao, Keiichi Enjyoji, Eva Csizmadia, Christa E. Müller, Takashi Murakami, and Simon C. Robson. 2010. "CD39/ENTPD1 Expression by CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells Promotes Hepatic Metastatic Tumor Growth in Mice." *Gastroenterology* 139 (3): 1030–40. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/20546740/>.
- Supernat, Anna, Aleksandra Markiewicz, Marzena Wełnicka-Jaśkiewicz, Barbara Seroczyńska, Jarosław Skokowski, Aleksandra Sejda, Jolanta Szade, Piotr Czapiewski, Wojciech Biernat, and Anna Zaczek. 2012. "CD73 Expression as a Potential Marker of Good Prognosis in Breast Carcinoma." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM* 20 (2): 103–7. <https://doi.org/10.1097/PAI.0B013E3182311D82>.
- Surprenant, A, F Rassendren, E Kawashima, RA North, and G Buell. 1996. "The Cytolytic P2Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2X Receptor (P2X7)." *Science (New York, N.Y.)* 272 (5262): 735–38. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5262.735>.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, and Jenny P.-Y. Ting. 2019. "The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics." *Nature Reviews Immunology* 2019 19:8 19 (8): 477–89. <https://doi.org/10.1038/S41577-019-0165-0>.

- Syberg, Susanne, Solveig Petersen, Jens-Erik Beck Jensen, Alison Gartland, Jenni Teilmann, Iain Chessell, Thomas H. Steinberg, Peter Schwarz, and Niklas Rye Jørgensen. 2012. "Genetic Background Strongly Influences the Bone Phenotype of P2X7 Receptor Knockout Mice." *Journal of Osteoporosis* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/391097>.
- Syberg, Susanne, Peter Schwarz, Solveig Petersen, Thomas H. Steinberg, Jens-Erik Beck Jensen, Jenni Teilmann, and Niklas Rye Jørgensen. 2012. "Association between P2X7 Receptor Polymorphisms and Bone Status in Mice." *Journal of Osteoporosis* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/637986>.
- Synnestvedt, Kristin, Glenn T. Furuta, Katrina M. Comerford, Nancy Louis, Jorn Karhausen, Holger K. Eltzschig, Karl R. Hansen, Linda F. Thompson, and Sean P. Colgan. 2002. "Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulation by Hypoxia-Inducible Factor-1 Mediates Permeability Changes in Intestinal Epithelia." *The Journal of Clinical Investigation* 110 (7): 993. <https://doi.org/10.1172/JCI15337>.
- Takenaka, Maisa C., Robson, Quintana FJ, Maisa C. Takenaka, Simon Robson, and Francisco J. Quintana. 2016. *Regulation of the T Cell Response by CD39*. Vol. 37. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/27236363/>.
- Tanha, Jamshid, Ping Xu, Zhigang Chen, Feng Ni, Howard Kaplan, Saran A. Narang, and C. Roger MacKenzie. 2001. "Optimal Design Features of Camelized Human Single-Domain Antibody Libraries." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (27): 24774–80. <https://doi.org/10.1074/JBC.M100770200>.
- Tatham, Peter E.R., and Manfred Lindau. 1990. "ATP-Induced Pore Formation in the Plasma Membrane of Rat Peritoneal Mast Cells." *Journal of General Physiology* 95 (3): 459–76. <https://doi.org/10.1085/JGP.95.3.459>.
- Taylor, Simon R. J., Mireya Gonzalez-Begne, Dorothy K. Sojka, Jill C. Richardson, Steven A. Sheardown, Stephen M. Harrison, Charles D. Pusey, Frederick W. K. Tam, and James I. Elliott. 2009. "Lymphocytes from P2X 7 - Deficient Mice Exhibit Enhanced P2X 7 Responses ." *Journal of Leukocyte Biology* 85 (6): 978–86. <https://doi.org/10.1189/jlb.0408251>.
- Taylor, Simon R.J., Clare M. Turner, James I. Elliott, John McDaid, Reiko Hewitt, Jennifer Smith, Matthew C. Pickering, et al. 2009. "P2X7 Deficiency Attenuates Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis." *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (6): 1275–81. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060559>.
- Taylor, SR, M Gonzalez-Begne, S Dewhurst, G Chimini, CF Higgins, JE Melvin, and JI Elliott. 2008. "Sequential Shrinkage and Swelling Underlie P2X7-Stimulated Lymphocyte Phosphatidylserine Exposure and Death." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (1): 300–308. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.1.300>.
- Thomas, LM, and RD Salter. 2010. "Activation of Macrophages by P2X7-Induced Microvesicles from Myeloid Cells Is Mediated by Phospholipids and Is Partially Dependent on TLR4." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (6): 3740–49. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1001231>.
- Tijink, Bernard M., Toon Laeremans, Marianne Budde, Marijke Stigter-Van Walsum, Torsten Dreier, Hans J. De Haard, C. René Leemans, and Guus A.M.S. Van Dongen. 2008. "Improved Tumor Targeting of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobodies through Albumin Binding: Taking Advantage of Modular Nanobody Technology." *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (8): 2288–97. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2384>.
- Todd, Jennifer N., Wenny Poon, Valeriya Lyssenko, Leif Groop, Brendan Nichols, Michael Wilmot, Simon Robson, et al. 2015. "Variation in Glucose Homeostasis Traits Associated With P2RX7 Polymorphisms in Mice and Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (5): E688. <https://doi.org/10.1210/JC.2014-4160>.
- Tomasinsig, Linda, Cinzia Pizzirani, Barbara Skerlavaj, Patrizia Pellegatti, Sara Gulinelli, Alessandro Tossi, Francesco Di Virgilio, and Margherita Zanetti. 2008. "The Human Cathelicidin LL-37 Modulates the Activities of the P2X7 Receptor in a Structure-Dependent Manner." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (45): 30471–81. <https://doi.org/10.1074/JBC.M802185200>.
- Trabanelli, Sara, Darina Očadlíková, Sara Gulinelli, Antonio Curti, Valentina Salvestrini, Rodolfo de Paula Vieira, Marco Idzko, Francesco Di Virgilio, Davide Ferrari, and Roberto M. Lemoli. 2012. "Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4+ T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (3): 1303–10. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1103800>.
- Trautmann, A. 2009. "Extracellular ATP in the Immune System: More than Just a 'Danger Signal.'" *Science Signaling* 2 (56). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.256PE6>.
- Tsukimoto, Mitsutoshi, Hitoshi Harada, Akira Ikari, and Kuniaki Takagi. 2005. "Involvement of Chloride in Apoptotic Cell Death Induced by Activation of ATP-Sensitive P2X7 Purinoceptor." *Journal of Biological*

- Chemistry* 280 (4): 2653–58. <https://doi.org/10.1074/JBC.M411072200>.
- Tsukimoto, Mitsutoshi, Machiko Maehata, Hitoshi Harada, Akira Ikari, Kuniaki Takagi, and Masakuni Degawa. 2006. "P2X7 Receptor-Dependent Cell Death Is Modulated during Murine T Cell Maturation and Mediated by Dual Signaling Pathways." *The Journal of Immunology* 177 (5): 2842–50. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.5.2842>.
- Turner, Clare M., Frederick W.K. Tam, P. C.Ping Chin Lai, Ruth M. Tarzi, G. Burnstock, Charles D. Pusey, H. Terence Cook, and Robert J. Unwin. 2007. "Increased Expression of the Pro-Apoptotic ATP-Sensitive P2X7 Receptor in Experimental and Human Glomerulonephritis." *Nephrology Dialysis Transplantation* 22 (2): 386–95. <https://doi.org/10.1093/NDT/GFL589>.
- Ulrich, Henning, Mariusz Z. Ratajczak, Gabriela Schneider, Elena Adinolfi, Elisa Orioli, Enéas G. Ferrazoli, Talita Glaser, et al. 2018. "Kinin and Purine Signaling Contributes to Neuroblastoma Metastasis." *Frontiers in Pharmacology* 9 (MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00500>.
- Vajjhala, Parimala R., Ruth E. Mirams, and Justine M. Hill. 2012. "Multiple Binding Sites on the Pyrin Domain of ASC Protein Allow Self-Association and Interaction with NLRP3 Protein *." *Journal of Biological Chemistry* 287 (50): 41732–43. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.381228>.
- Vaupel, Peter, and Arnulf Mayer. 2016. "Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 876: 177. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22.
- Vaupel, Peter, and Gabriele Multhoff. 2017. "Accomplices of the Hypoxic Tumor Microenvironment Compromising Antitumor Immunity: Adenosine, Lactate, Acidosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Potassium Ions, and Phosphatidylserine." *Frontiers in Immunology* 8 (DEC): 1887. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01887/BIBTEX>.
- Vázquez-Cuevas, Francisco G, Angélica S Martínez-Ramírez, Leticia Robles-Martínez, Edith Garay, Alejandro García-Carrancá, Delia Pérez-Montiel, Carolina Castañeda-García, and Rogelio O Arellano. 2014. "Paracrine Stimulation of P2X7 Receptor by ATP Activates a Proliferative Pathway in Ovarian Carcinoma Cells." *J. Cell. Biochem* 115: 1955–66. <https://doi.org/10.1002/jcb.24867>.
- Veit, Martin, Katharina Isabelle Koyro, Björn Ahrens, Florian Bleibaum, Martin Munz, Hagen Rövekamp, Jörg Andrä, et al. 2018. "Anoctamin-6 Regulates ADAM Sheddase Function." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1865 (11 Pt A): 1598–1610. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.08.011>.
- Vergani, A, S Tezza, F D'Addio, C Fotino, K Liu, M Niewczasz, R Bassi, et al. 2013. "Long-Term Heart Transplant Survival by Targeting the Ionotropic Purinergic Receptor P2X7." *Circulation* 127 (4): 463–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123653>.
- Vergani, Andrea, Carmen Fotino, Francesca D'Addio, Sara Tezza, Michele Podetta, Francesca Gatti, Melissa Chin, et al. 2013. "Effect of the Purinergic Inhibitor Oxidized ATP in a Model of Islet Allograft Rejection." *Diabetes* 62 (5): 1665–75. <https://doi.org/10.2337/DB12-0242>.
- Vieira, Cátia, Maria Teresa Magalhães-Cardoso, Fátima Ferreirinha, Isabel Silva, Ana Sofia Dias, Julie Pelletier, Jean Sévigny, and Paulo Correia-De-Sá. 2014. "Feed-Forward Inhibition of Cd73 and Upregulation of Adenosine Deaminase Contribute to the Loss of Adenosine Neuromodulation in Postinflammatory Ileitis." *Mediators of Inflammation* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/254640>.
- Vijayan, Dipti, Arabella Young, Michele W.L. Teng, and Mark J. Smyth. 2017. "Targeting Immunosuppressive Adenosine in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 17 (12): 709–24. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>.
- Virgilio, F. Di, and E. Adinolfi. 2017. "Extracellular Purines, Purinergic Receptors and Tumor Growth." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>.
- Virgilio, Francesco Di, Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi, and Elena Adinolfi. 2018. "Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment." *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>.
- Virgilio, Francesco Di, Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi, Elena Adinolfi, Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi, and Elena Adinolfi. 2018. "Extracellular ATP and P2 Purinergic Signalling in the Tumour Microenvironment." *Nature Reviews Cancer* 18 (10): 601–18. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>.
- Virgilio, Francesco Di, Diego Dal Ben, Alba Clara Sarti, Anna Lisa Giuliani, and Simonetta Falzoni. 2017. "The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation." *Immunity* 47 (1): 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.
- Virgilio, Francesco Di, Simonetta Falzoni, Anna Lisa Giuliani, and Elena Adinolfi. 2016. "P2 Receptors in Cancer Progression and Metastatic Spreading." *Current Opinion in Pharmacology* 29 (August): 17–25.

- <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2016.05.001>.
- Virgilio, Francesco Di, Anna L. Giuliani, Valentina Vultaggio-Poma, Simonetta Falzoni, and Alba C. Sarti. 2018. "Non-Nucleotide Agonists Triggering P2X7 Receptor Activation and Pore Formation." *Frontiers in Pharmacology* 9 (FEB): 39. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00039>.
- Virgilio, Francesco Di, Günther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2018. "The Elusive P2X7 Macropore." *Trends in Cell Biology* 28 (5): 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.005>.
- Virgilio, Francesco Di, Yong Tang, Alba Clara Sarti, and Marco Rossato. 2020. "A Rationale for Targeting the P2X7 Receptor in Coronavirus Disease 19." *British Journal of Pharmacology* 177 (21): 4990–94. <https://doi.org/10.1111/BPH.15138>.
- Virginio, C, A MacKenzie, FA Rassendren, RA North, and A Surprenant. 1999. "Pore Dilation of Neuronal P2X Receptor Channels." *Nature Neuroscience* 2 (4): 315–21. <https://doi.org/10.1038/7225>.
- Vultaggio-Poma, Valentina, Simonetta Falzoni, Giada Salvi, Anna Lisa Giuliani, and Francesco Di Virgilio. 2022. "Signalling by Extracellular Nucleotides in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1869 (5): 119237. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119237>.
- Walker, Lucy S.K., and David M. Sansom. 2015. "Confusing Signals: Recent Progress in CTLA-4 Biology." *Trends in Immunology* 36 (2): 63. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2014.12.001>.
- Walunas, Theresa L., Deborah J. Lenschow, Christina Y. Bakker, Peter S. Linsley, Gordon J. Freeman, Jonathan M. Green, Craig B. Thompson, and Jeffrey A. Bluestone. 1994. "CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation." *Immunity* 1 (5): 405–13. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X).
- Wan, Han-Xing, Jian-Hong Hu, Rei Xie, Shi-Ming Yang, Hui Dong, Han-Xing Wan, Jian-Hong Hu, Rei Xie, Shi-Ming Yang, and Hui Dong. 2016. "Important Roles of P2Y Receptors in the Inflammation and Cancer of Digestive System." *Oncotarget* 7 (19): 28736–47. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7518>.
- Wang, B, and R. Sluyter. 2013. "P2X7 Receptor Activation Induces Reactive Oxygen Species Formation in Erythroid Cells." *Purinergic Signalling* 9 (1): 101–12. <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9335-2>.
- Wang, Dan, Phillip W.L. Tai, and Guangping Gao. 2019. "Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery." *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (5): 358–78. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>.
- Wang, Long, Jie Fan, Linda F. Thompson, Yi Zhang, Tahiro Shin, Tyler J. Curiel, and Bin Zhang. 2011. "CD73 Has Distinct Roles in Nonhematopoietic and Hematopoietic Cells to Promote Tumor Growth in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2371–82. <https://doi.org/10.1172/JCI45559>.
- Wang, X, G Arcuino, T Takano, J Lin, WG Peng, P Wan, P Li, et al. 2004. "P2X7 Receptor Inhibition Improves Recovery after Spinal Cord Injury." *Nature Medicine* 10 (8): 821–27. <https://doi.org/10.1038/NM1082>.
- Wang, Xuan, Yunsheng Li, Yanrong Qian, Yanyang Cao, Pratik Shriwas, Haiyun Zhang, and Xiaozhuo Chen. 2017. "Extracellular ATP, as an Energy and Phosphorylating Molecule, Induces Different Types of Drug Resistances in Cancer Cells through ATP Internalization and Intracellular ATP Level Increase." *Oncotarget* 8 (50): 87860–77. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21231>.
- Wang, Yidan, Isabelle Martins, Yuting Ma, Oliver Kepp, Lorenzo Galluzzi, and Guido Kroemer. 2013. "Autophagy-Dependent ATP Release from Dying Cells via Lysosomal Exocytosis." *Autophagy* 9 (10): 1624–25. <https://doi.org/10.4161/AUTO.25873>.
- Wang, Z., H. I. Ma, J. Li, L. Sun, J. Zhang, and X. Xiao. 2003. "Rapid and Highly Efficient Transduction by Double-Stranded Adeno-Associated Virus Vectors in Vitro and in Vivo." *Gene Therapy* 10:26 10 (26): 2105–11. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302133>.
- Wanhainen, Kelsey M, Stephen C Jameson, and Henrique Borges. 2019. "Self-Regulation of Memory CD8 T Cell Metabolism through Extracellular ATP Signaling." *Immunometabolism*, 3–8. <https://doi.org/10.20900/immunometab20190009>.
- Wanner, Nicola, Thomas Eden, Nastassia Liaukouskaya, and Friedrich Koch-Nolte. 2021. "Nanobodies: New Avenue to Treat Kidney Disease." *Cell and Tissue Research* 385 (2): 445. <https://doi.org/10.1007/S00441-021-03479-8>.
- Waterhouse, Paul, Josef M. Penninger, Emma Timms, Andrew Wakeham, Arda Shahinian, Kelvin P. Lee, Craig B. Thompson, Henrik Griesser, and Tak W. Mak. 1995. "Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctlα-4." *Science (New York, N.Y.)* 270 (5238): 985–88. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5238.985>.
- Webb, TE, J Simon, BJ Krishek, AN Bateson, TG Smart, BF King, G Burnstock, and EA Barnard. 1993. "Cloning and Functional Expression of a Brain G-Protein-Coupled ATP Receptor." *FEBS Letters* 324 (2): 219–25. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81397-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81397-I).

- Weber, Felix C., Philipp R. Esser, Tobias Müller, Jayanthi Ganesan, Patrizia Pellegatti, Markus M. Simon, Robert Zeiser, Marco Idzko, Thilo Jakob, and Stefan F. Martin. 2010. "Lack of the Purinergic Receptor P2X7 Results in Resistance to Contact Hypersensitivity." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (12): 2609. <https://doi.org/10.1084/JEM.20092489>.
- Wei, Linyu, Emily Caseley, Dongliang Li, and Lin-Hua Jiang. 2016. "ATP-Induced P2X Receptor-Dependent Large Pore Formation: How Much Do We Know?" *Frontiers in Pharmacology* 0 (JAN): 5. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2016.00005>.
- Wesolowski, Janusz, Vanina Alzogaray, Jan Reyelt, Mandy Unger, Karla Juarez, Mariela Urrutia, Ana Cauerhff, et al. 2009. "Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity." *Medical Microbiology and Immunology* 198 (3): 157–74. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7>.
- Wiley, JS, R Chen, MJ Wiley, and GP Jamieson. 1992. "The ATP4- Receptor-Operated Ion Channel of Human Lymphocytes: Inhibition of Ion Fluxes by Amiloride Analogs and by Extracellular Sodium Ions." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 292 (2): 411–18. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90010-T](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90010-T).
- Wiley, JS, and GR Dubyak. 1989. "Extracellular Adenosine Triphosphate Increases Cation Permeability of Chronic Lymphocytic Leukemic Lymphocytes." *Blood* 73 (5): 1316–23. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V73.5.1316.1316>.
- Wilhelm, Konrad, Jayanthi Ganesan, Tobias Müller, Christoph Dürr, Melanie Grimm, Andreas Beilhack, Christine D. Krempf, et al. 2010. "Graft-versus-Host Disease Is Enhanced by Extracellular ATP Activating P2X7R." *Nature Medicine* 16 (12): 1434–39. <https://doi.org/10.1038/NM.2242>.
- Wilson, HL, SA Wilson, A Surprenant, and R A North. 2002. "Epithelial Membrane Proteins Induce Membrane Blebbing and Interact with the P2X7 Receptor C Terminus." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 34017–23. <https://doi.org/10.1074/JBC.M205120200>.
- Woehrle, T, L Yip, A Elkhail, Y Sumi, Y Chen, Y Yao, PA Insel, and WG Junger. 2010. "Pannexin-1 Hemichannel-Mediated ATP Release Together with P2X1 and P2X4 Receptors Regulate T-Cell Activation at the Immune Synapse." *Blood* 116 (18): 3475–84. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-04-277707>.
- Woo, Seng-Ryong Ryong, Mercedes B. Fuertes, Leticia Corrales, Stefani Spranger, Michael J. Furdyna, Michael Y.K. K Leung, Ryan Duggan, et al. 2014. "No Title." *Immunity* 41 (5): 830. [/pmc/articles/PMC4384884/](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.008).
- Woods, Lucas T., Jean M. Camden, Josef M. Batek, Michael J. Petris, Laurie Erb, and Gary A. Weisman. 2012. "P2X7 Receptor Activation Induces Inflammatory Responses in Salivary Gland Epithelium." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 303 (7): C790. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00072.2012>.
- Wykes, Michelle N., Lynette Beattie, Gordon G. Macpherson, and Derek N. Hart. 2004. "Dendritic Cells and Follicular Dendritic Cells Express a Novel Ligand for CD38 Which Influences Their Maturation and Antibody Responses." *Immunology* 113 (3): 318–27. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2004.01968.X>.
- Xu, Dong, Doug McCarty, Alda Fernandes, Michael Fisher, R. J. Samulski, and R. L. Juliano. 2005. "Delivery of MDR1 Small Interfering RNA by Self-Complementary Recombinant Adeno-Associated Virus Vector." *Molecular Therapy* 11 (4): 523–30. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2004.12.019>.
- Xu, XJ, M Boumechache, LE Robinson, V Marschall, DC Gorecki, M Masin, and RD Murrell-Lagnado. 2012. "Splice Variants of the P2X7 Receptor Reveal Differential Agonist Dependence and Functional Coupling with Pannexin-1." *Journal of Cell Science* 125 (Pt 16): 3776–89. <https://doi.org/10.1242/JCS.099374>.
- Yan, Juming, Xian-Yang Li, Amelia Roman Aguilera, Christos Xiao, Celia Jacobberger-Foisac, Bianca Nowlan, Simon C. Robson, et al. 2020. "Control of Metastases via Myeloid CD39 and NK Cell Effector Function." *Cancer Immunology Research*, January, canimm.0749.2019. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0749>.
- Yan, Zonghe, Shuo Li, Zhaodong Liang, Melanija Tomić, and Stanko S. Stojilkovic. 2008. "The P2X7 Receptor Channel Pore Dilates under Physiological Ion Conditions." *The Journal of General Physiology* 132 (5): 563. <https://doi.org/10.1085/JGP.200810059>.
- Yang, Dahai, Yuan He, Raul Muñoz-Planillo, Qin Liu, and Gabriel Núñez. 2015. "Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock." *Immunity* 43 (5): 923–32. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.10.009>.
- Yang, Grace S., Michael Schmidt, Ziyang Yan, Jonathan D. Lindbloom, Thomas C. Harding, Brian A. Donahue, John F. Engelhardt, Robert Kotin, and Beverly L. Davidson. 2002. "Virus-Mediated Transduction of Murine Retina with Adeno-Associated Virus: Effects of Viral Capsid and Genome Size." *Journal of Virology* 76 (15): 7651–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.15.7651-7660.2002>.
- Yegutkin, Gennady G., Kaisa Auvinen, Pia Rantakari, Maija Hollmén, Marika Karikoski, Reidar Grénman, Kati

- Elima, Sirpa Jalkanen, and Marko Salmi. 2015. "Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 Enhances Endothelial Barrier Function and Sprouting in Blood but Not Lymphatic Vasculature." *European Journal of Immunology* 45 (2): 562–73. <https://doi.org/10.1002/EJI.201444856>.
- Yegutkin, Gennady G., Fumiko Marttila-Ichihara, Marika Karikoski, Jussi Niemelä, Juha P. Laurila, Kati Elima, Sirpa Jalkanen, and Marko Salmi. 2011. "Altered Purinergic Signaling in CD73-Deficient Mice Inhibits Tumor Progression." *European Journal of Immunology* 41 (5): 1231–41. <https://doi.org/10.1002/EJI.201041292>.
- Yegutkin, Gennady G., Sergei S. Samburski, and Sirpa Jalkanen. 2003. "Soluble Purine-Converting Enzymes Circulate in Human Blood and Regulate Extracellular ATP Level via Counteracting Pyrophosphatase and Phosphotransfer Reactions." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (10): 1328–30. <https://doi.org/10.1096/FJ.02-1136FJE>.
- Yegutkin, Gennady G., Sergei S. Samburski, Stefan P. Mortensen, Sirpa Jalkanen, and José González-alonso. 2007. "Intravascular ADP and Soluble Nucleotidases Contribute to Acute Prothrombotic State during Vigorous Exercise in Humans." *The Journal of Physiology* 579 (Pt 2): 553–64. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2006.119453>.
- Yip, Linda, Tobias Woehrle, Ross Corriden, Mark Hirsh, Yu Chen, Yoshiaki Inoue, Vhe Ferrari, Paul A. Insel, and Wolfgang G. Junger. 2009a. "Autocrine Regulation of T-Cell Activation by ATP Release and P2X 7 Receptors." *FASEB Journal* 23 (6): 1685–93. <https://doi.org/10.1096/fj.08-126458>.
- . 2009b. "Autocrine Regulation of T-Cell Activation by ATP Release and P2X7 Receptors." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (6): 1685–93. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-126458>.
- Ylä-Herttua, Seppo. 2012. "Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union." *Molecular Therapy* 20 (10): 1831. <https://doi.org/10.1038/MT.2012.194>.
- Young, Chris N.J., and Dariusz C. Górecki. 2018. "P2RX7 Purinoceptor as a Therapeutic Target-The Second Coming?" *Frontiers in Chemistry* 6 (JUN): 248. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00248>.
- Young, Christopher NJ, Anthony Sinadinos, Alexis Lefebvre, Philippe Chan, Stephen Arkle, David Vaudry, and Dariusz C Gorecki. 2015. "A Novel Mechanism of Autophagic Cell Death in Dystrophic Muscle Regulated by P2RX7 Receptor Large-Pore Formation and HSP90." <http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insertbiblio.Inist.Fr/10.4161/15548627.2014.994402> 11 (1): 113–30. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.994402>.
- Young, M T, P Pelegrin, and A Surprenant. 2006. "Identification of Thr283 as a Key Determinant of P2X7 Receptor Function." *British Journal of Pharmacology* 149 (3): 261. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706880>.
- Yu, Joanne L., Linda May, Vladimir Lhotak, Siranoush Shahrzad, Senji Shirasawa, Jeffrey I. Weitz, Brenda L. Coomber, Nigel Mackman, and Janusz W. Rak. 2005. "Oncogenic Events Regulate Tissue Factor Expression in Colorectal Cancer Cells: Implications for Tumor Progression and Angiogenesis." *Blood* 105 (4): 1734–41. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-05-2042>.
- Zhang, Haiyan, Dipti Vijayan, Xian-Yang Li, Simon C. Robson, Nishamol Geetha, Michele W. L. Teng, and Mark J. Smyth. 2019. "The Role of NK Cells and CD39 in the Immunological Control of Tumor Metastases." *Oncotmunology* 8 (6): e1593809. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593809>.
- Zhang, Lin, Jose R. Conejo-Garcia, Dionyssios Katsaros, Phyllis A. Gimotty, Marco Massobrio, Giorgia Regnani, Antonis Makrigiannakis, et al. 2003. "Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer." *The New England Journal of Medicine* 348 (3): 203–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA020177>.
- Zhang, Wen jun, Chen Luo, Chao Huang, Fan qin Pu, Jin feng Zhu, and Zheng ming Zhu. 2021. "PI3K/Akt/GSK-3β Signal Pathway Is Involved in P2X7 Receptor-Induced Proliferation and EMT of Colorectal Cancer Cells." *European Journal of Pharmacology* 899 (May). <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.174041>.
- Zhang, Xinge, and Guilin Li. 2019. "P2Y Receptors in Neuropathic Pain." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 186 (November): 172788. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2019.172788>.
- Zhao, Jijun, Hongyue Wang, Chao Dai, Hongyang Wang, Hui Zhang, Yuefang Huang, Shuang Wang, Felicia Gaskin, Niansheng Yang, and Shu Man Fu. 2013. "P2X7 Blockade Attenuates Murine Lupus Nephritis by Inhibiting Activation of the NLRP3/ASC/Caspase 1 Pathway." *Arthritis and Rheumatism* 65 (12): 3176–85. <https://doi.org/10.1002/ART.38174>.
- Zhi, Xiuling, Yingjian Wang, Xuerui Zhou, Jerry Yu, Rongrong Jian, Shaoxian Tang, Lianhua Yin, and Ping Zhou. 2010. "RNAi-Mediated CD73 Suppression Induces Apoptosis and Cell-Cycle Arrest in Human Breast Cancer Cells." *Cancer Science* 101 (12): 2561–69. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2010.01733.X>.

- Zhou, Yi, Mingjian Fei, Gu Zhang, Wei-Ching Ching Liang, WeiYu Yu Lin, Yan Wu, Robert Piskol, et al. 2020. "Blockade of the Phagocytic Receptor MerTK on Tumor-Associated Macrophages Enhances P2X7R-Dependent STING Activation by Tumor-Derived CGAMP." *Immunity* 52 (2): 357-373.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.014>.
- Ziberi, Sihana, Mariachiara Zuccarini, Marzia Carluccio, Patricia Giuliani, Lucia Ricci-Vitiani, Roberto Pallini, Francesco Caciagli, Patrizia Di Iorio, and Renata Ciccarelli. 2019. "Upregulation of Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and P2X7 Receptors Is Associated to Increased Invasiveness Caused by P2X7 Receptor Stimulation in Human Glioblastoma Stem Cells." *Cells* 2020, Vol. 9, Page 859 (1): 85. <https://doi.org/10.3390/CELLS9010085>.
- Zimmermann, Herbert, Matthias Zebisch, and Norbert Sträter. 2012. "Cellular Function and Molecular Structure of Ecto-Nucleotidases." *Purinergic Signalling* 8 (3): 437–502. <https://doi.org/10.1007/S11302-012-9309-4>.

Annexes

Collaboration, présentation d'un poster à la ESGCT

Towards a single-shot prime-boost AAV-based vaccine for cancer immunotherapy

A Franke, M Demeules, R Hardet, L Prager, M Bentler, N Jäschke, TC Ha, U Hacker, S Adriouch, H Büning

Background

Cancer is still among the leading causes of death with nearly 10 million people that died in 2020, highlighting the need for innovative treatment strategies. Cancer immunotherapies, like CAR-based therapies, immune checkpoint blockade, or vaccines, are examples for such novel treatment options

developed for improving the efficiency of cancer therapies. Adeno-associated virus (AAV) vectors have become the in vivo gene delivery tool of choice with marketing authorizations for AAV vector-based gene therapies for monogenetic inherited diseases. Previously, we developed the single-shot prime-boost AAV vector-based vaccine strategy (Fig. 1) as novel vaccine platform and demonstrated its potency in inducing antigen-specific B cell responses

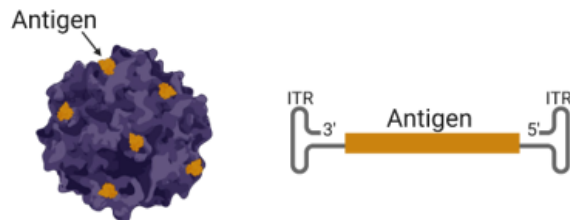
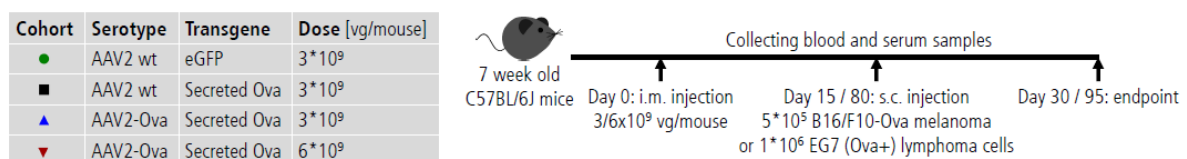


Figure 1: Schematic depiction of the "single-shot prime-boost" AAV-based vaccine strategy: the antigen is presented on the capsid surface and also encoded as transgene by the vector. The proof-of-concept in regard to antigen-specific B cell responses was already demonstrated by our group⁴. (Created with BioRender.com)

Aim and Strategy

Developing the single-shot prime-boost vaccine concept towards a cancer immunotherapy vaccine platform. Requirement: Induction of antigen-specific B and T cell responses Strategy: Well-described model antigen ovalbumin (Ova) as target antigen for the single-shot prime-boost vaccine.

- Model-antigen Ova "displayed" on the capsid surface for priming of the immune system.
- Model-antigen Ova secreted from transduced cells to boost antigen-specific immune responses.



- Testing a prophylactic anti-tumor single-shot prime-boost vaccine strategy in the context of the syngeneic B16/F10-Ova and EG-7 (Ova+) tumor models—inoculated either 15 or 80 days post-immunization.

Conclusion

The AAV-based single-shot prime-boost vaccine induced the production of Ova-specific CD4⁺ helper T cells, resulting in the production of anti-Ova IgG antibodies, as well as of CD8⁺ cytotoxic T cells.

This Ova-specific immune response was potent in inhibiting the growth of Ova-expressing tumor cells, specifically of the more immunogenic EG7 (Ova⁺) lymphoma cells and of the more aggressive B16/F10-Ova melanoma cells.

- Cohorts treated with the prime-boost vaccine construct demonstrated remarkably impaired tumor growth or even a complete lack of tumor engraftment, also when tumors were inoculated 80 days post immunization.
- Establishment of a novel AAV-based anti-tumor vaccine strategy.
- ➔ Next step: Test the AAV-based anti-tumor vaccine strategy with clinically relevant cancer-related antigens.

Results

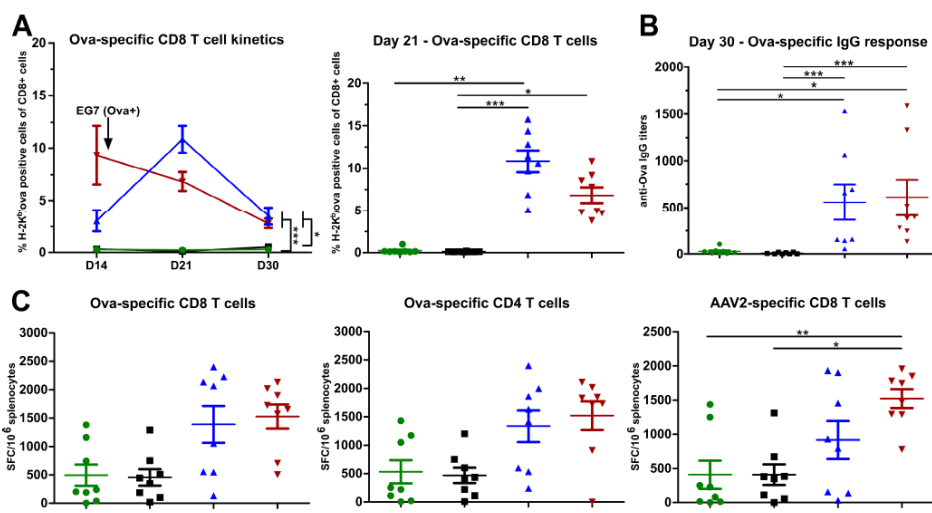


Figure 2: Ova-targeting prime-boost vaccine induces strong Ova-specific cytotoxic and humoral immune responses in mice.

Representative figures from one tumor-take experiment. Animals were i.m. injected with the indicated vector dose and 1×10^6 EG7 (Ova+) cells were s.c. injected at day 15 post immunization. (A) Percentage of Ova-specific CD8⁺ T cells measured via dextramer staining at day 14, 21, and 30 post immunization. (B) Ova-specific humoral immune response measured via ELISA at the endpoint. (C) Number of functional Ova-specific CD8⁺ (left) and CD4⁺ (middle), as well as AAV2 capsid-specific CD8⁺ (right) T cells in 1E6 splenocytes measured via IFN- γ ELISpots at the endpoint. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

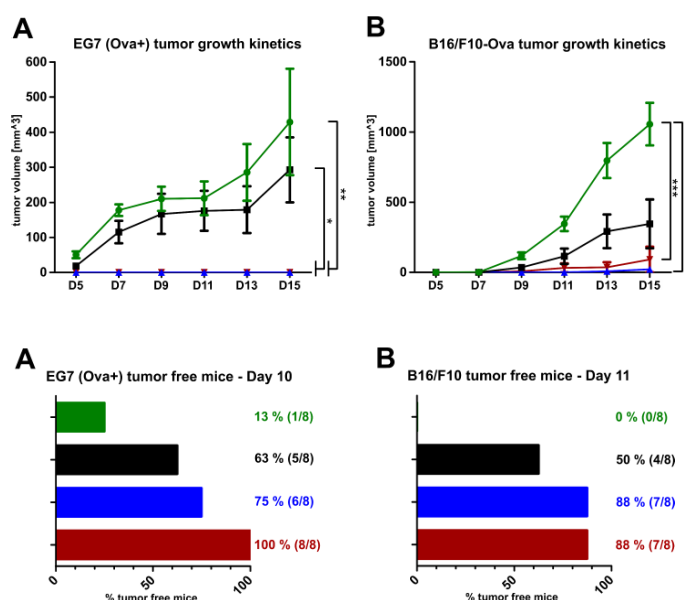


Figure 3: Prime-boost vaccine-based Ova-specific immune response potentially inhibits the growth of Ova-expressing tumor cells, when tumor cells were injected at day 15 post immunization.

Animals were i.m. injected with the indicated vector dose and (A) 1×10^6 EG7 (Ova+) or (B) 5×10^5 B16/F10-Ova cells were s.c. injected at day 15 post immunization. The tumor growth kinetics until the endpoint at day 30 is depicted. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 4: Prime-boost vaccine-based Ova-specific immune response potentially inhibits the growth of Ova-expressing tumor cells, also when tumor cells were injected at day 80 post immunization.

Animals were i.m. injected with the indicated vector dose and (A) 1×10^6 EG7 (Ova+) or (B) 5×10^5 B16/F10-Ova cells were s.c. injected at day 80 post immunization. The number and percentage of tumor free animals at day 10 or 11 post tumor cell injection, respectively, is depicted.

Résumé

Le récepteur P2X7 est un canal cationique sensible à l'ATP. Il est exprimé à la surface de diverses cellules immunitaires, en particulier les monocytes, les macrophages et les Tregs. P2X7 joue un rôle central dans l'inflammation en raison de sa capacité à activer l'inflammasome NLRP3 et à libérer de l'IL-1 β et de l'IL-18. Son activation prolongée conduit à la formation d'un macropore non sélectif permettant l'entrée de molécules allant jusqu'à 900 Da et entraînant la mort cellulaire. Il est également exprimé par les cellules tumorales, cependant son rôle dans le cancer reste complexe. Afin d'étudier la modulation de P2X7 dans l'inflammation et le cancer, nous avons mis au point la méthodologie AAVnano. Nous avons testé plusieurs constructions basées sur des nanobodies sous différents formats afin de sélectionner un antagoniste spécifique de P2X7 (13A7-hcAb) et un potentialisateur de P2X7

(14D5-dimHLE) modulant à long terme l'activité de ce récepteur. Nous avons validé cette méthodologie dans l'inflammation aiguë et chronique du colon dans un modèle DSS. Bloquer P2X7 permettait de diminuer le score clinique tandis que le potentialiser augmentait ce score. Dans le contexte tumoral, nous avons utilisé des greffes syngéniques ectopiques sous-cutanées. Nous avons démontré qu'inhiber P2X7 permettait de réduire le volume tumoral quand la tumeur l'exprime. La potentialisation de P2X7 en combinaison avec une chimiothérapie induisant la mort immunogénique permet de stimuler les réponses immunitaires antitumorales, de diminuer le volume tumoral et d'améliorer la survie des animaux. Nous avons également combiné 14D5-dimHLE avec d'autres AAVnano ciblant PD-L1 (PD-L1-dimHLE), CD73 (CD73-dimHLE) ou les deux (CD73/PD-L1-HLE) dans deux modèles tumoraux. La combinaison de 14D5-dimHLE avec PD-L1-dimHLE a montré des effets bénéfiques sur le volume tumoral et la survie des animaux. Pour finir, la construction bispécifique CD73/PD-L1-HLE seule ou en combinaison avec 14D5-dimHLE permettait de diminuer de façon plus importante le volume tumoral des animaux.

Abstract

P2X7 receptor is an ATP-sensitive cation channel expressed on the surface of various immune cells, in particular monocytes, macrophages and Tregs. P2X7 plays a central role in inflammation due to its ability to activate the NLRP3 inflammasome and to release IL-1 β and IL-18. Its prolonged activation leads to the formation of a non-selective macropore allowing the entry of molecules up to 900 Da and leads to cell death. It is also expressed by tumour cells, however its role in cancer is still complex. To study the modulation of P2X7 in inflammation and cancer, we developed the AAVnano methodology. We tested several nanobody-based constructs and different formats allowing us to select a specific P2X7 antagonist (13A7-hcAb) and a P2X7 potentiator (14D5-dimHLE) modulating the activity of this receptor in the long term. We confirmed this methodology in acute and chronic colon inflammation in a DSS model. Blocking P2X7 decreased the clinical score while potentiating it increased the score. In the tumor context, we used subcutaneous syngeneic transplant and demonstrated that inhibiting P2X7 reduces tumor volume when the tumor expresses this receptor. Stimulation of P2X7 in combination with immunogenic death-inducing chemotherapy resulted in enhanced antitumor immune responses, reduced tumor volume and improved animal survival. We also tested the combination of 14D5-dimHLE with other AAVnano targeting PD-L1 (PD-L1-dimHLE), CD73 (CD73-dimHLE) or both (CD73/PD-L1-HLE) in two tumor models. The combination of 14D5-dimHLE with the PD-L1-dimHLE results in reduced tumor volume and improved animal survival. The CD73/PD-L1-HLE bispecific alone or in combination with 14D5-dimHLE construct was able to reduce the tumor volume of the animals to a greater extent.