



HAL
open science

Impact du cholestérol circulant et membranaire sur les fonctions cellulaires induites par P2X7 et la sévérité de pathologies auto-immunes de type lupique

Tom Hutteau-Hamel

► To cite this version:

Tom Hutteau-Hamel. Impact du cholestérol circulant et membranaire sur les fonctions cellulaires induites par P2X7 et la sévérité de pathologies auto-immunes de type lupique. Immunité adaptative. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL024 . tel-03881024

HAL Id: tel-03881024

<https://theses.hal.science/tel-03881024>

Submitted on 1 Dec 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.

Impact du cholestérol circulant et membranaire sur les fonctions cellulaires induites par P2X7 et la sévérité de pathologies auto-immunes de type lupique

Impact of circulating and plasma membrane cholesterol on P2X7 induced cellular responses and lupus severity

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 Signalisations et réseaux intégratifs en biologie « BIOSIGNE »

Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans les unités de recherche UMR 1174 Interactions Cellulaires et Physiopathologie Hépatiques et

UMR 996 Inflammation Microbiome et Immunosurveillance (Université Paris-Saclay, INSERM)

Sous la direction de Pierre Bobé, Professeur

Thèse soutenue à l'Université Paris-Saclay, le 15 septembre 2022, par

Tom HUTTEAU-HAMEL

Composition du Jury

Dr. Nadine Varin-Blank

Directrice de Recherche

Université Sorbonne Paris Nord (Unité Inserm UMR 978)

Présidente

Dr. Andres Alcover

Directeur de Recherche

Institut Pasteur (Unité Inserm 1224)

Rapporteur & Examineur

Pr. Hang Korng EA

Professeur d'Université-Praticien Hospitalier

Université de Paris (Unité Inserm UMR 1132)

Rapporteur & Examineur

Dr. Natalie Fournier

Maitre de conférences Universitaire-Praticienne Hospitalier

Université Paris Saclay (Unité Universitaire Interdisciplinaire

Lip(Sys)²)

Examinatrice

Pr. Pierre Bobé

Professeur d'Université

Université Paris Saclay (Unité Inserm UMR 996)

Directeur de thèse

Remerciements

J'exprime ma reconnaissance envers l'ensemble des membres de mon jury. Je remercie le Dr. Andres Alcover et le Pr. Hang Korgn EA d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail de thèse ainsi que les Dr. Nadine Varin Blank et Dr. Natalie Fournier de l'avoir examiné.

Je remercie également l'ensemble des membres des unités de recherche aux seins desquels j'ai eu la chance de travailler.

Un grand merci donc aux chercheurs, techniciens, doctorants, post doctorants, étudiants que j'ai eu l'occasion de rencontrer au cours de ma thèse et qui m'auront tant apporté ces cinq dernières années, d'un point de vue scientifique mais aussi pour tout le reste. Des résultats sportifs en tout genre avec Gregory Merlen, aux conseils nutritionnels discutables de Nicolas « Kiki » Kahale, en passant par de grandes réflexions philosophiques (pas toujours répétables) avec Camille Le Guilcher. De façon plus générale, un grand merci à Thierry Tordjmann, Laurent Combette, Boris Julien, Olivier Dellis, Isabelle Doignon, Isabelle Garcin, Olivier Fayol, Laure « Madame Villemain » Le Hagne, Julien « Juliano » Gautherot, Valeska Jourdainne, Marion Almes, Mauricette Collado et Brigitte Grosse.

Un grand merci également aux membres de l'unité 996 qui m'a accueillie en cours de thèse, Françoise Bachelerie, Géraldine Schlecht-Louf, Claire Deback, Viviana Marin Esteban, Anne-Marie Cassard et Nicolas Trainel, Roman Krzysiek, Françoise Mercier-Nomé, Marie-Laure Aknin et Sophie Viel, Marta Lagana, Molène Docq, Camille Houron, Clément Dominguez. Mais aussi ceux que je n'ai que brièvement croisés, Sarah, Vincent, Narham, Julie, Joyce.

J'adresse également mes remerciements aux membres Châtenaisiens de l'unité, et en particulier à mon interlocuteur moto, Kevin Hardonnière.

Je souhaite remercier de façon plus particulière :

- Karim Benihoud et Hervé Daniel pour la qualité du Master 2 que j'ai eu l'opportunité d'intégrer et les compétences que j'ai pu y acquérir.
- Mickael Bourge pour la transmission de ses compétences en cytométrie en flux qui m'ont suivi tout au long de mes travaux de thèses.
- Jean Kanellopoulos, pour sa maîtrise sans faille de la bibliographie et de fait pour les débats sans fin qui en découlent, ses compétences et son aide précieuse dans les manips de biochimie que j'ai pu entreprendre et bien sûr pour sa capacité impressionnante à détecter des contrepèteries là où elles n'existent pas toujours.
- Heather Mclean qui aura eu la très bonne idée de me forcer à faire les TD de L2, merci pour ta gentillesse et tout ce que tu m'auras apporté au cours de ce monitorat.

Quelques remerciements spéciaux,

À Pierre bien sûr, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Ces 5 années de thèse ont non seulement été possibles grâce à toi, mais elles ont aussi été enrichissantes, surprenantes parfois, drôles très souvent, et agréables tout du long. J'ai grâce à toi acquis une expérience inestimable dans bien des domaines, directement lié (ou pas) à la science. Je me considère extrêmement chanceux et privilégié d'avoir pu partager ces années charnières de ma carrière avec un tel mentor.

A Amine évidemment, mon « encadrant » vite devenu un ami. Merci pour tout, ta gentillesse, ton intelligence, ta culture et ta curiosité. J'ai tant appris grâce à toi, techniquement, scientifiquement mais aussi sur plein d'autres sujets (la découverte d'Hunter x Hunter par exemple, quelle erreur de passer à côté de ça). J'ai eu beaucoup de chance de partager mes années de thèse avec toi, je n'aurais pas pu rêver meilleur compagnon d'aventure.

À nous trois, on fait un sacré trio. Je suis très heureux d'avoir eu l'occasion de vous rencontrer et de maintenant vous compter parmi mes proches.

Autre trio légendaire, un grand merci à Tom et Guillaume, dont l'apport ne se résume certainement pas à un pari pour une bouteille de rhum, même si c'est que retiendra la légende.

À mes frères Terry et Felix qui sans le savoir peut-être, sont des piliers sur lesquels repose une grande partie de ma motivation et de mon envie de bien faire. Merci d'être si fier de moi, c'est une force immense que vous me donnez.

À ma maman, qui m'aura apporté son amour, son intelligence, sa filouterie et son optimisme sans faille. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours tant soutenu et motivé quand c'était difficile et aussi d'avoir su me botter le cul quand les difficultés ne venaient que de moi.

À mes deux papas, tout le monde n'a pas la chance d'avoir double dose d'amour et de soutien paternel. Je suis extrêmement chanceux.

Mon papa Wiwy, tu m'auras apporté ta rigueur, ta persévérance, ton sens de l'observation et ton ouverture aux autres, mais surtout un amour inconditionnel.

Mon papa David, de toi je tiens mon côté plus relax, plus rebelle peut être, associé à une logique sans faille, et un caractère bien trempé, mais aussi un peu plus de timidité et de pudeur.

Je pense être maintenant un mélange de tout ça, et ce que je suis maintenant, grâce à vous, me rend fier d'être votre fils.

Pour Mouna enfin, sans qui je ne serais certainement pas la même personne aujourd'hui. Merci pour ta patience, ton amour, ton soutien, ta gentillesse. Merci de m'avoir autant soutenu et rassuré quand je baissais les bras. Merci d'avoir joué le mauvais rôle en me « forçant » à me bouger le cul quand j'étais feignant. Merci d'avoir su me supporter les nombreuses fois où mon mauvais caractère prenait le dessus. Tu me donne une force que je n'aurais jamais sans toi. Je suis si fier de nous, de ce qu'on a accomplis, et d'où on en est maintenant, ensemble.

Un peu en vrac pour finir mais pas moins important,

Merci à mes grands-parents, Jack et Sylviane, pour leur amour sans faille, leurs bontés et la famille qu'ils ont su créer autour d'eux. À ma mamie Ginette qui m'a toujours aimé sans conditions, les souvenirs sont peut-être difficiles à atteindre, mais on sait qu'ils sont toujours là, au fond de ton cœur. À mes cousins, les deux Kevin, qui ont été l'un et l'autre des grands frères pour moi. À mon oncle et ma tante, Agnès et Michel, qui m'ont transmis la rigueur (mais aussi la rigolade) au travail à l'époque du marché. À Titou et Capu, mes compagnons d'aventures de l'UVSQ, dont les méthodes de révisions ont été testées et désapprouvées.

Table des matières

Table des matières.....	5
Table des illustrations.....	8
Abréviations.....	10
I. Introduction.....	12
1. Lymphocytes T et lupus érythémateux disséminé.....	15
a) Maturation thymique et tolérance centrale.....	15
i. Différentiation des lymphocytes T et maturation thymique.....	15
ii. Sélection positive.....	17
iii. Sélection négative et tolérance centrale.....	18
iv. Sélection et développement des lymphocytes tTreg.....	19
v. Anomalies des mécanismes de la tolérance centrale à l'origine d'auto-immunité.....	20
b) Activation des lymphocytes T et tolérance périphérique.....	21
i. Rôle de la cellule dendritique immunogène dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T.....	22
ii. Rôle de la cellule dendritique tolérogène dans le maintien de la tolérance périphérique.....	23
iii. Formation de la synapse immunologique.....	24
iv. Rôle du récepteur purinergique P2X7 dans la maturation des cytokines inflammatoires.....	25
c) Signalisation TCR et son altération dans le lupus érythémateux disséminé.....	26
i. Signalisation par le TCR en condition physiologique.....	26
ii. Altération de la signalisation TCR dans le lupus érythémateux disséminé.....	29
d) Influence des domaines membranaires de signalisation dans l'auto-immunité.....	30
i. Plateformes membranaires de signalisation.....	31
ii. Influence des radeaux lipidiques sur la signalisation TCR.....	34
e) Expansion clonale des lymphocytes T.....	36
i. Modification du taux de cholestérol membranaire en réponse à l'activation du lymphocyte T.....	37
f) Différenciation et fonction des lymphocytes T effecteurs.....	38
i. Lymphocytes T helper.....	39
ii. Rôle de P2X7 dans l'orientation phénotypique.....	43
iii. Lymphocytes T cytotoxiques.....	45
g) Mémoire immunitaire.....	47

i.	Lymphocytes T mémoires centraux.....	48
ii.	Lymphocytes T résidents mémoires	48
iii.	Lymphocytes T effecteurs mémoires	49
h)	Régulation de la réponse immunitaire et maintien de la tolérance périphérique....	49
i.	Lymphocytes T régulateurs	49
ii.	Régulation de la réponse immunitaire par les ectonucléotidases CD39 et CD73 ..	51
iii.	Défaut de régulation et perte de tolérance périphérique.....	53
i)	Homéostasie des lymphocytes T	54
i.	Initiation de l'apoptose par la voie intrinsèque BIM	54
ii.	Initiation de l'apoptose par la voie extrinsèque Fas/FasL	55
iii.	Phase effectrice de la mort cellulaire par apoptose.....	55
iv.	Élimination des cellules apoptotiques par phagocytose	57
v.	Rupture d'homéostasie et perte de tolérance périphérique	58
2.	Structure et fonction des récepteurs purinergiques P2X7	60
a)	Signalisation purinergique	60
b)	Expression et fonctions cellulaires de P2X7.....	63
c)	Différences de sensibilité de P2X7 en fonction des sous-types de lymphocytes T...	65
3.	Cholestérol membranaire.....	66
a)	Synthèse du cholestérol	69
i.	Synthèse par la voie endogène	69
ii.	Apport par la voie exogène	71
iii.	Régulation du taux de cholestérol par efflux ou stockage intracellulaire	73
II.	Objectifs	77
III.	P2X7 receptor activation by extracellular ATP in mouse T-cell lines depends on its plasma membrane localization driven by membrane cholesterol content	80
IV.	A new mouse model of autoimmune lymphoproliferative syndrome reveals a major role for P2X7 in T-cell homeostasis and lupus pathogenesis.....	117
V.	Hypercholesterolemia negatively regulate P2X7-induced cellular function in CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T-cell subsets from B6 mice fed a high-fat diet.....	135
VI.	Conclusion et Discussion	157
VII.	Travaux en collaboration	170
a)	Functional cooperation of the hedgehog and androgen signalling pathways during developmental and repairing myelination	170
VIII.	References.....	196

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma résumant les voies physiologiques et pathologiques d'homéostasies des lymphocytes T effecteurs en réponse secondaire	14
Figure 2 : Étapes de maturation des lymphocytes T et B à partir des common lymphoid progenitor (CLP).....	16
Figure 3 : Schéma des différentes étapes de maturation d'un lymphocyte T au sein du thymus	17
Figure 4 : Mécanisme d'apprêtement des peptides du soi par les cellules corticales de l'épithélium thymique lors de la sélection positive.	18
Figure 5 : Mécanisme de tolérance thymique	19
Figure 6 : Devenir des thymocytes auto-réactifs en fonction de la dose d'antigène exprimé dans le thymus.....	20
Figure 7 : Orientation des cellules dendritiques vers un phénotype tolérogène ou immunogène.....	21
Figure 8 : Voies de signalisations menant à l'activation du lymphocyte T ou à son anergie	22
Figure 9: Mécanismes moléculaires permettant à la DC tolérogène d'orienter le lymphocyte T vers le phénotype régulateur	24
Figure 10: Synapse immunologique et molécules de signalisation associées	25
Figure 11: Voies cellulaires de maturation des cytokines dépendantes de P2X7	26
Figure 12: Voies de signalisations associées à l'activation du TCR.....	27
Figure 13: Voies de signalisation intracellulaire associées à la molécule de costimulation CD28	28
Figure 14: Altérations des voies de signalisation du lymphocyte T au cours du LED.....	30
Figure 15 : Structure d'un radeau lipidique membranaire	32
Figure 16 : Influence d'une dérégulation d'homéostasie du cholestérol sur la formation des radeaux lipidiques.....	34
Figure 17 : Rôle de CD28 dans la formation des radeaux lipidiques et de la synapse immunologique.....	35
Figure 18 : Effet de l'activation du lymphocyte T sur le métabolisme du cholestérol	38
Figure 19 : Types de lymphocytes T effecteurs et les signaux cytokiniques associés à leur différenciation	39

Figure 20 : Voies Notch impliquées dans l'orientation vers un phénotype effecteur Th1 ou Th2	40
Figure 21 : Structure des récepteurs à l'IL-23 et à l'IL-12	42
Figure 22 : Principales caractéristiques des différents sous-types de lymphocytes T helper et les signaux associés à leur orientation et leurs fonctions	43
Figure 23 : Rôle de la L-selectine CD62L dans la localisation tissulaire des lymphocytes T	44
Figure 24 : Mode d'action intracellulaire de la voie cytotoxique perforine/granzyme	46
Figure 25 : Mécanismes de régulation de la réponse immunitaire par le Treg	50
Figure 26 : Voie d'hydrolyses de l'ATP extracellulaire menant à la production d'adénosine ...	51
Figure 27 : Effet de la signalisation Adénosine sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+	52
Figure 28 : Homéostasie des lymphocytes T en réponse à une infection	54
Figure 29 : Signalisation intracellulaires des voies d'apoptose BIM et Fas/FasL	56
Figure 30 : Effet anti-inflammatoire de la phagocytose des cellules apoptotiques	58
Figure 31 : Structure et signalisation par les différents types de P2Y	61
Figure 32 : Cristallographie d'un monomère de P2X7 de poisson zèbre et représentation schématique de P2X7 à la membrane plasmique	62
Figure 33 : Fonctions cellulaires de P2X7 en réponse une stimulation par l'ATP ⁴⁻	65
Figure 34 : Schéma de l'intégration du cholestérol au sein des membranes plasmiques	67
Figure 35 : Voie de biosynthèse métabolique du cholestérol et structure de ses dérivés	68
Figure 36 : Influence du cholestérol et des sphingolipides sur la fluidité et la rigidité membranaire	69
Figure 37 : Métabolisme cellulaires du cholestérol	70
Figure 38 : Mécanismes cellulaires de régulation du taux de cholestérol	71
Figure 39 : Mécanisme cellulaire d'import de cholestérol	73
Figure 40 : Formation des HDL et export du cholestérol	74
Figure 41 : Différentes voies d'échanges de cholestérol entre le macrophage et les HDL	75
Figure 42 : Structure des esters de cholestérol formé en intracellulaire ou dans le plasma sanguin	76

Abréviations

IL : Interleukine

Immunoglobuline : Ig

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CCL : CC- Chemokine ligand

CTL : Cytotoxic T lymphocyte

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CXCL : CX Chemokine ligand

cTEC : Cortical Thymic Epithelium Cell

pCMH : Complexe CMH peptide

PS : Phosphatidylsérine

Th : T helper

T_{CM} : Lymphocytes T mémoires centraux

T_{RM} : Lymphocytes T résidents mémoires

T_{EM} : Lymphocytes T effecteurs mémoires

TCR : T-cell receptor

Treg : Lymphocytes T régulateurs

I. Introduction

La dérégulation de l'homéostasie des lymphocytes T matures joue un rôle important dans la physiopathologie du lupus érythémateux systémique/disséminé (LES/LED). Des altérations des voies d'apoptoses Fas et BIM sont impliquées dans cette rupture d'homéostasie. Ainsi, une déficience en récepteur Fas entraîne chez les patients ALPS (Autoimmune LymphoProliferative Syndrome) ou les souris modèles MRL-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) une accumulation massive de lymphocytes T de phénotype particulier caractérisé par un TCR de type $\alpha\beta$, la perte des molécules de surface CD4⁺ ou CD8⁺ et l'expression constitutive de l'isoforme RABC (ou B220) de la tyrosine phosphatase de membrane CD45 d'où leur nom de lymphocytes T DN B220⁺.

Dès l'âge de 3 mois, les souris MRL/*lpr* femelles et mâles présentent une splénomégalie et des adénopathies, dues à l'accumulation de lymphocytes T DN B220⁺, et un lupus sévère. Ces lymphocytes T sont responsables d'une dérégulation massive du réseau cytokinique, d'une forte production d'auto-anticorps dirigés contre les constituants du noyau cellulaire dont l'ADN double brin/natif (ADNdb) et de lésions cutanées, pulmonaires, rénales et articulaires. Ces auto-anticorps participent également aux lésions rénales (glomérulonéphrite) responsables d'une mort prématurée des souris MRL/*lpr* vers l'âge de 4 ou 5 mois. Le fond génétique est essentiel pour le développement de la maladie lupique. Ainsi, dans le fond génétique C57BL/6 (B6), la mutation *lpr* (souris B6/*lpr*) n'entraîne l'apparition que d'un faible nombre de lymphocytes T DN B220⁺ et peu d'atteintes tissulaires ce qui indique que le fond génétique MRL contient d'autres gènes impliqués dans la sévérité de la maladie (gènes de susceptibilité). Cependant, le fond MRL reste encore mal connu puisqu'il résulte du croisement de plusieurs lignées de souris : LG, AKR, C3H et C57BL/6 ce qui rend difficile l'analyse génétique des mécanismes responsables de la pathologie. D'autre part, notre laboratoire a montré que les lymphocytes T pathologiques DN B220⁺ des souris MRL/*lpr* réduisent drastiquement l'expression membranaire et la fonctionnalité du récepteur purinergique P2X7 [1]. En conséquence, nous avons émis l'hypothèse que P2X7 pourrait, en synergie avec le récepteur d'apoptose Fas, jouer un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T effecteurs et la sévérité du LED. Pour vérifier notre hypothèse, des souris B6 ont été rendues déficientes pour les récepteurs Fas (mutation *lpr*) et P2X7 (inactivation génétique). Ces souris, dénommées B6/*lpr*-P2X7KO, présentent dès l'âge de 4 mois une accumulation massive de

lymphocytes T DN B220⁺ dans les ganglions lymphatiques (adénopathies) et la rate (splénomégalie) équivalente voire supérieure à celle des souris MRL/lpr (Figure 1). Elles possèdent également des quantités sériques élevées d'auto-anticorps anti-ADNdb et une dérégulation du réseau cytokinique ce qui n'est pas le cas des souris B6/lpr qui ne présentent qu'une pathologie modérée et des souris B6-P2X7KO qui ne présentent aucun phénotype particulier. Enfin, les souris B6/lpr-P2X7KO ont une durée de vie significativement réduite puisque plus de 50% d'entre elles sont mortes à l'âge de 20 semaines (Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, Front. Immunol., 2022). De plus, dans les lymphocytes T normaux, nous avons montré que le taux d'expression du P2X7 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ (conventionnels et régulateurs) et CD8⁺ ainsi que la sensibilité du récepteur P2X7 à son ligand l'ATP extracellulaire varient en fonction de leur état d'activation et de différenciation [2, 3].

Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressé à l'influence de la dynamique membranaire sur la fonctionnalité de P2X7 dans les lymphocytes T en lien avec les différences de développement du LED chez les souris lupiques MRL/lpr et B6/lpr. Ainsi, j'ai émis l'hypothèse que le taux de cholestérol circulant pourrait influencer l'organisation des microdomaines membranaires de signalisation des lymphocytes T normaux et pathologiques et être responsable des différences de sensibilité du récepteur P2X7 à l'ATP. J'ai donc recherché, *in vitro* et *in vivo*, l'existence de liens entre la régulation du métabolisme du cholestérol et la fonctionnalité du récepteur P2X7 selon l'état d'activation et de différenciation des lymphocytes T. Pour ce faire, j'ai mis au point les techniques de modulation et de quantification des taux de cholestérol membranaire ainsi que les protocoles permettant de déterminer la localisation du récepteur P2X7 au sein des domaines membranaires. J'ai ainsi pu démontrer, *in vitro*, sur des lignées lymphocytaires T tumorales, l'influence du taux de cholestérol membranaire, basal ou modulé, sur les fonctions cellulaires induites par le récepteur P2X7. J'ai également pu mettre en évidence, *ex vivo*, une variation des taux de cholestérol membranaire selon l'état d'activation et de différenciation des lymphocytes T normaux ou pathologiques et que ces différences impactent la fonctionnalité de P2X7. De plus, j'ai montré chez des souris normales B6 soumises à un régime enrichi en cholestérol que le taux de cholestérol membranaire des lymphocytes T et surtout leur sensibilité à l'ATP⁴⁻ est dépendante du taux de cholestérol

circulant. Enfin, des traitements hypo- et hyper-cholestérolémiants sont actuellement réalisés pour évaluer l'impact du taux de cholestérol circulant sur la sévérité des pathologies auto-immunes des souris MRL/lpr et B6/lpr.

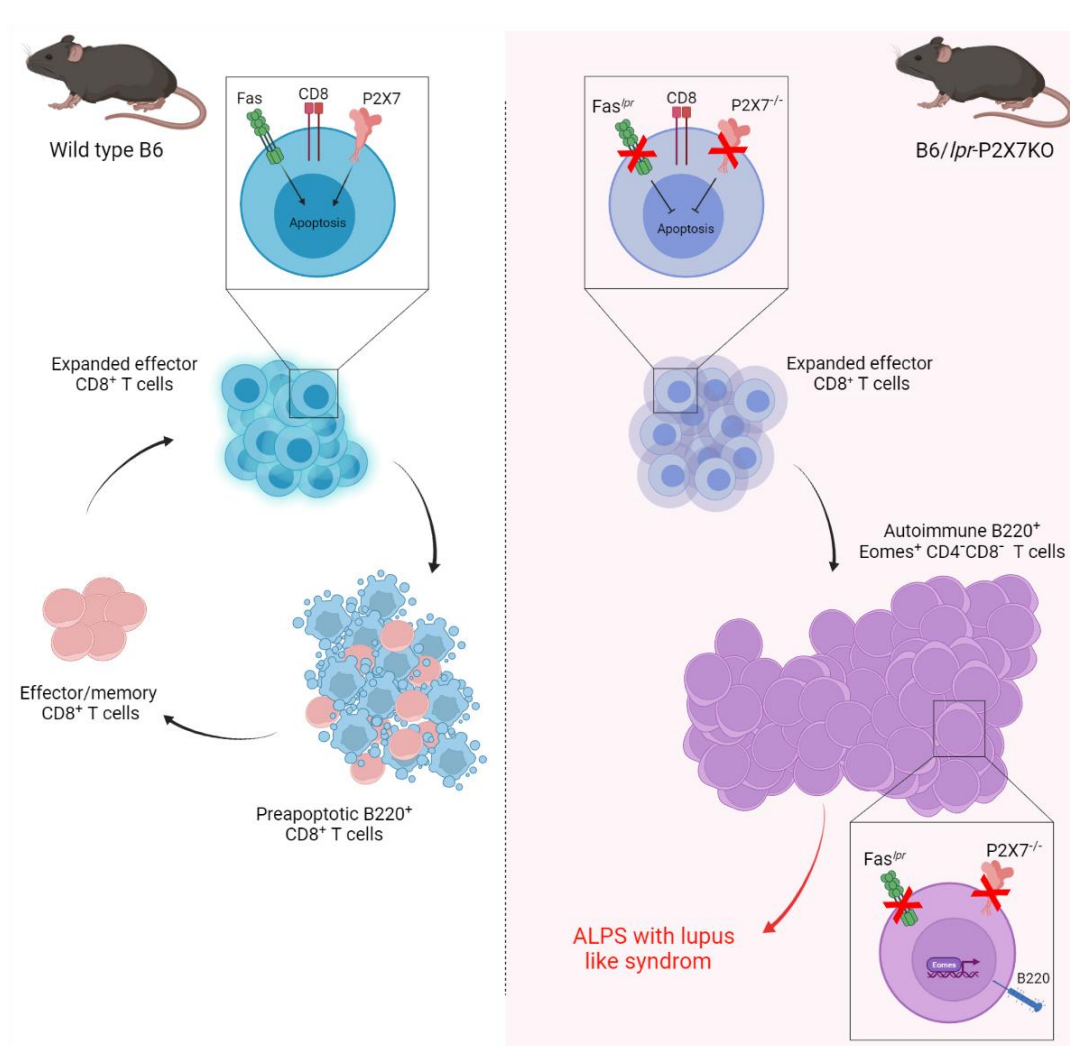


Figure 1 : Schéma résumant les voies physiologiques et pathologiques d'homéostasies des lymphocytes T effecteurs en réponse secondaire

Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, *Front. Immunol.*, 2022

1. Lymphocytes T et lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune systémique multifactorielle dont l'étiologie reste mal définie car d'origine, génétique, environnemental et hormonal. Elle affecte environ 5 millions de personnes à travers le monde, majoritairement des femmes (9 femmes pour 1 homme) de 20 à 45 ans. De nombreux types cellulaires immunitaires ont été impliqués dans le développement et la sévérité de cette pathologie comme les cellules phagocytaires, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les lymphocytes T et B pour la production d'auto-anticorps anti-ADN double brin (ADNdb) et les lésions tissulaires notamment rénale lors de la néphrite lupique. Deux mécanismes distincts de tolérance contrôlent le pool de lymphocytes T auto-réactifs, et donc une potentielle auto-immunité, lors de la maturation au niveau central thymique et au niveau périphérique lors de l'activation et de la phase effectrice.

a) Maturation thymique et tolérance centrale

L'étape la plus précoce de la maturation du lymphocyte T est la migration de la CLP (Common Lymphoid Progenitor) de la moelle osseuse vers le thymus [4]. C'est au sein de cet organe lymphoïde primaire que le lymphocyte T va subir ses différentes étapes de maturation : 1) réarrangement des chaînes du TCR, 2) sélection positive et 3) sélection négative ou tolérance centrale. Cette étape de sélection négative permettra aussi la génération des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs d'origine thymique (tTreg).

i. Différentiation des lymphocytes T et maturation thymique

La migration des CLP, dérivées de cellules souches hématopoïétiques (HSC), depuis la moelle osseuse vers le thymus se fera sous l'influence des chimiokines CCL21 et CCL25 produites par le thymus et leurs récepteurs CCR7 et CCR9 exprimés par les CLP [5, 6]. La maturation des CLP en thymocytes dépendra de l'activation de la voie Notch/Delta. En effet, les cellules épithéliales thymiques expriment le ligand delta like 4 (DLL4) du récepteur Notch 1 des CLP. L'activation de Notch 1 par son ligand induit un signal de survie de la CLP et sa différenciation vers le phénotype pro-T. À l'inverse, les CLP dont le récepteur Notch 1 ne sera pas activé par DLL4 vont être éliminés par apoptose dépendante de la protéine BIM. L'importance de la voie Notch dans la maturation thymique a été démontrée par des expériences de transgénèse dans

lesquelles une déficience en DLL4 entraîne la perte totale des lymphocytes T sans impacter le pool de lymphocytes B. À l'inverse, l'expression de DLL4 dans la moelle osseuse entraîne l'apparition d'un pool de lymphocytes pro-T dans cet organe et la perte des lymphocytes B.

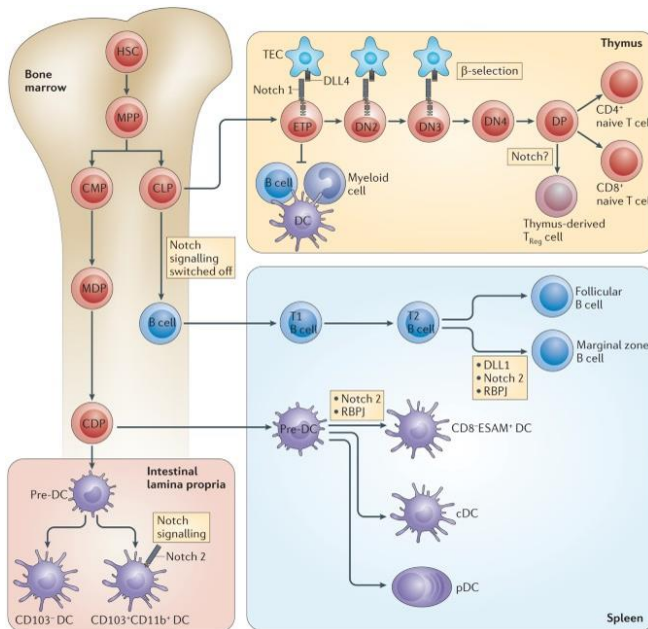


Figure 2 : Étapes de maturation des lymphocytes T et B à partir des common lymphoid progenitor (CLP)

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) vont se différencier dans la moelle osseuse en CLP à l'origine des lymphocytes T et B. Sous l'action de chimiokines, les CLP vont migrer vers le thymus ou elles se différencieront en lymphocytes T alors que les CLP séquestrées dans la moelle vont s'orienter vers le lignage lymphocytaire B, d'après Ratke et al., [7].

Le lymphocyte pro-T, de phénotype double négatif pour CD4 et CD8 (DN), va passer par quatre stades de maturation caractérisés par l'expression des marqueurs de surface CD44 et CD25 : DN1 ou early thymic progenitor (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) et DN4 (CD44⁻CD25⁻) (Figure 2) [6, 8]. Cette maturation se fait sous le contrôle de la voie Notch/DLL et de l'interleukine 7 [9-11] qui est fortement produite par les cellules corticales de l'épithélium thymique (cTEC). La voie Notch/DLL permet également l'expression de la recombinaison RAG 1/2 (Recombination Activating Gene) qui va permettre, au stade DN3, le réarrangement des segments géniques V, D et J du locus β du TCR [12, 13]. La fonctionnalité de la chaîne β réarrangée va être testée pour sa capacité à induire un signal d'activation lorsqu'elle s'associe à la chaîne pré- α non polymorphe pour former un pré-TCR. Si le réarrangement de la chaîne β est non fonctionnel sur les deux locus, le lymphocyte T est éliminé par apoptose dépendante de la protéine BIM. C'est le premier point de contrôle du développement lymphocytaire T, appelé β -sélection [14, 15]. Les lymphocytes T exprimant un pré-TCR fonctionnel vont ensuite effectuer le réarrangement de la chaîne α du TCR et atteindre le stade DN4. Si le thymocyte DN4 exprime un TCR $\alpha\beta$ fonctionnel, il va progresser vers le stade double positif CD4⁺ CD8⁺ (DP) (Figure 3). Le taux de Notch1 va ensuite drastiquement diminuer entre le stade DN4 et DP.

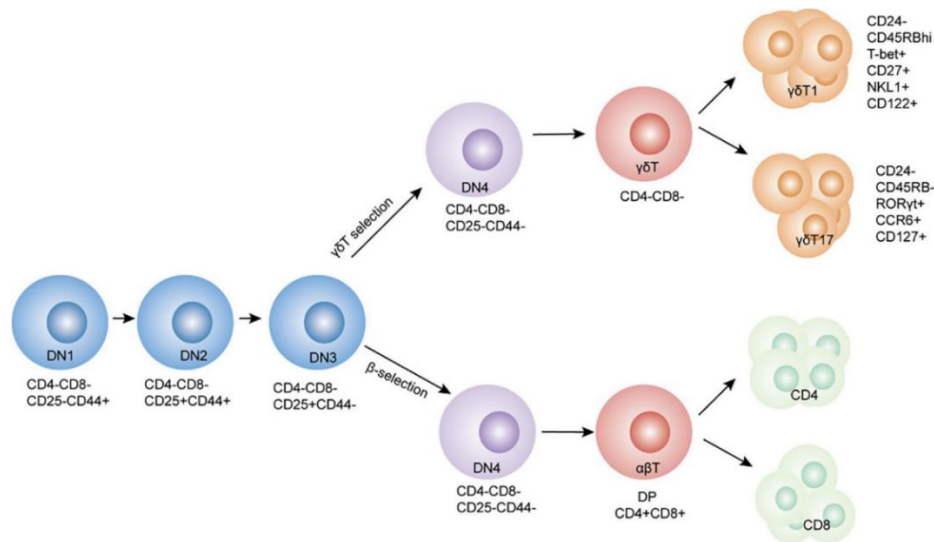


Figure 3 : Étapes principales de maturation des thymocytes

Contrairement aux CLP, les cellules DN1 expriment la molécule d'adhérence CD44. L'expression de la chaîne alpha ou CD25 du récepteur à l'IL-2 est associée au stade DN2. Au stade DN3, les cellules subissent un réarrangement de la chaîne β du TCR et perdent l'expression de CD44. Si le TCR β réarrangé est capable d'induire un signal d'activation cellulaire alors la cellule passe au stade DN4. Le locus α du TCR subit alors lui aussi le réarrangement et les molécules CD4 et CD8 de co-reconnaissance du CMH sont exprimées à la membrane si le TCR $\alpha\beta$ est fonctionnel. Les thymocytes TCR $\alpha\beta^{\text{low}} CD4^+CD8^+$ sont dits double positifs (DP), d'après Qi et al., [16].

L'expression par les thymocytes d'un TCR de type $\gamma\delta$ (1 à 5% des lymphocytes T périphériques) est fortement dépendante de la force du signal TCR. L'activation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ extracellulaire va potentialiser le signal TCR via la phosphorylation de la kinase ERK et la stimulation de l'expression du facteur de transcription *Egr* (Early growth response) et donc orienter le thymocyte DN3 vers le phénotype $\gamma\delta$. Il a d'ailleurs été montré que les thymocytes DN $\gamma\delta$ présente un taux d'expression de P2X7 plus élevé que les thymocytes DN3 $\alpha\beta$. [17]

ii. Sélection positive

Les thymocytes TCR $\alpha\beta^{\text{low}} CD4^+CD8^+$ (DP) vont subir l'étape de sélection positive dont le but est d'évaluer la capacité de leur TCR à reconnaître les molécules de classe I ou de classe II du CMH exprimées à la surface des cellules du cortex thymique (cTEC). Si le TCR du thymocyte DP peut reconnaître le produit d'un locus d'une molécule de classe I ou II du CMH, le thymocyte survivra et sera orienté vers le phénotype simple positif $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$ (SP) (Figures 4 et 5) [18-20]. Les thymocytes dont le TCR est incapable de réaliser cette interaction avec une molécule du CMH seront orientés vers une apoptose mitochondriale dépendante de la protéine BIM [21].

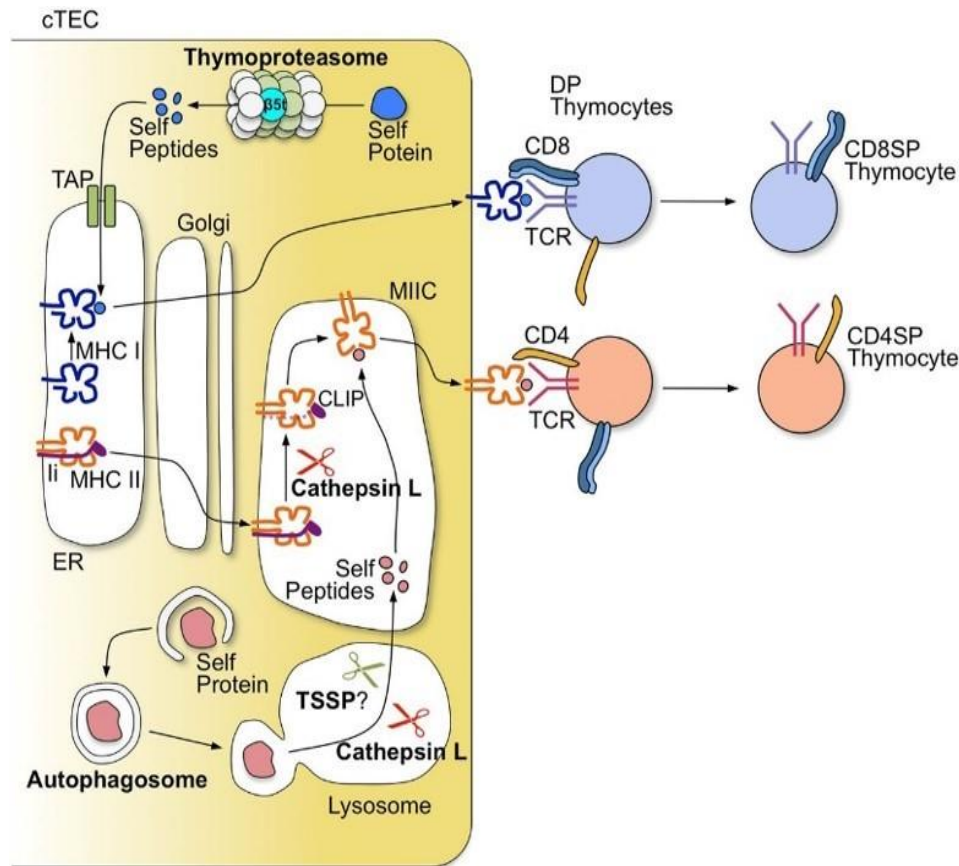


Figure 4 : Mécanismes d'apprêtement des peptides du soi par les cellules corticales de l'épithélium thymique lors de la sélection positive.

Les peptides présentés par les molécules de classe I du CMH dépendent de la dégradation de protéines du soi en peptides par le thymoprotéasome. Ces peptides sont envoyés au RE par le transporteur TAP puis associés au CMH I. Les peptides présentés par les molécules de classe II du CMH sont issus de la dégradation par la cathepsin L des lysosomes des protéines du soi capturées par l'autophagosome. La molécule de CMH II synthétisée dans le RE va migrer vers les lysosomes ou elle pourra être chargée en peptide. Les complexes CMH/peptide vont ensuite migrer à la membrane de la cellule corticale et être présentés aux lymphocytes T double positif (DP). Les lymphocytes T DP reconnaissant le complexe CMH I/peptide perdront l'expression du CD4 et deviendront simple positif (SP) CD8⁺ alors que ceux reconnaissant le complexe CMH II/peptide perdront l'expression du CD8 et deviendront simple positif CD4⁺, d'après Takada et al., [19]

iii. Sélection négative et tolérance centrale

Les thymocytes SP de phénotype activé (CD62L^{low}CD69^{hi}) vont ensuite subir la phase de sélection négative. Les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) vont présenter à leur surfaces, grâce au facteur de transcription AIRE (Auto-Immune REgulator) [22, 23], les peptides dérivés essentiellement des organes endocriniens, par les molécules de classe I et II du CMH. Les cellules dendritiques peuvent également migrer des tissus périphériques vers la jonction cortico-médullaire du thymus ou la médulla pour présenter les peptides du soi. Ceux-

ci peuvent également être amenés au thymus par la circulation sanguine et être présentés par des DC thymiques. Les thymocytes SP possédant une trop forte avidité pour les complexes CMH/peptides du soi seront éliminés afin de limiter le nombre de lymphocytes T auto-réactifs en périphérie (Figures 5 et 6) [21, 24]. Les lymphocytes T ayant passé les phases de sélection positive et négative sont dits matures naïfs et vont exprimer les récepteurs membranaires S1P₁ qui leurs permettront de sortir du thymus afin de rejoindre la circulation sanguine en suivant le gradient de concentration en protéine S1P (Sphingosine 1-Phosphate) fortement exprimée dans la circulation sanguine [25-27].

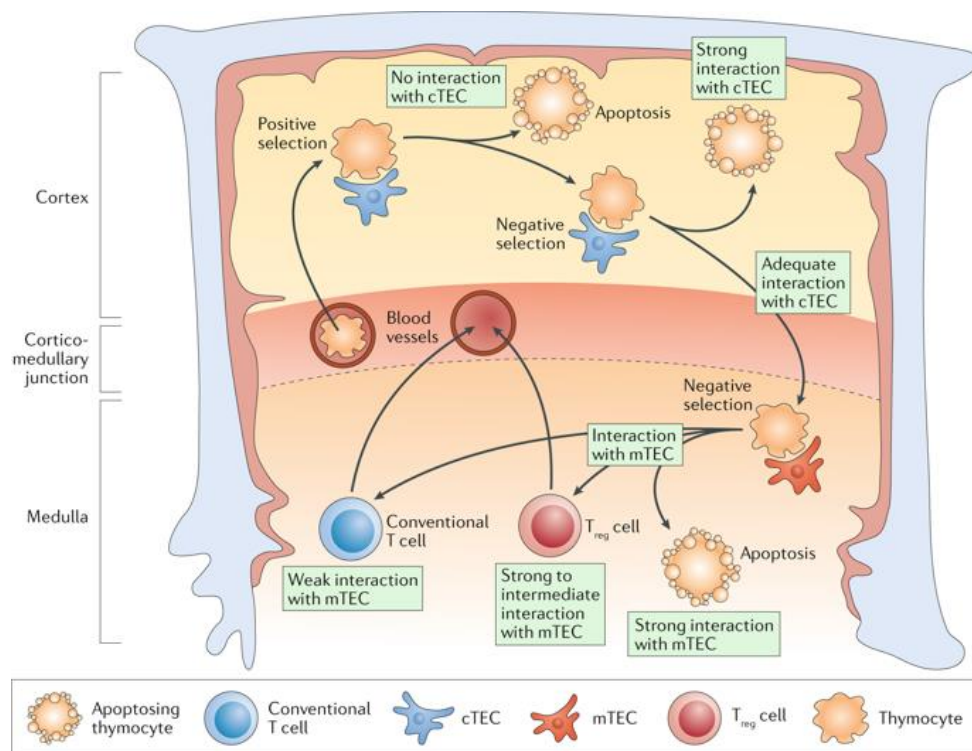


Figure 5 : Mécanisme de tolérance thymique

Les lymphocytes T DP subissent l'étape de sélection positive au sein du cortex thymique, si l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide porté par les cTEC est possible, le lymphocyte T DP est conservé et migre vers la médulla thymique. Si l'avidité d'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide du soi porté par les mTEC est trop forte, le lymphocyte T DP entre en apoptose. Une partie des lymphocytes T DP ayant reconnu les peptides du soi seront cependant conservés et deviendront des lymphocytes T régulateurs d'après Allende et al., [28].

iv. Sélection et développement des lymphocytes tTreg

En plus de son rôle d'induction de tolérance centrale par la sélection négative, le thymus est également responsable de la maturation des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs thymiques [29]. Lors de la sélection négative, les thymocytes dont le TCR présente une avidité pour les complexes CMH/peptides du soi légèrement inférieure au seuil déclenchant la mort par

apoptose vont survivre et être orientés vers le phénotype tTreg (Figure 6) [30-35]. De plus, la forte expression des molécules B7 par les mTEC va fournir aux thymocytes un signal de costimulation par le récepteur CD28 qui induira l'expression du facteur de transcription Foxp3 responsable de la production de cytokines anti-inflammatoires, notamment TGF- β et IL-10, caractéristiques du phénotype T régulateur [36-38].

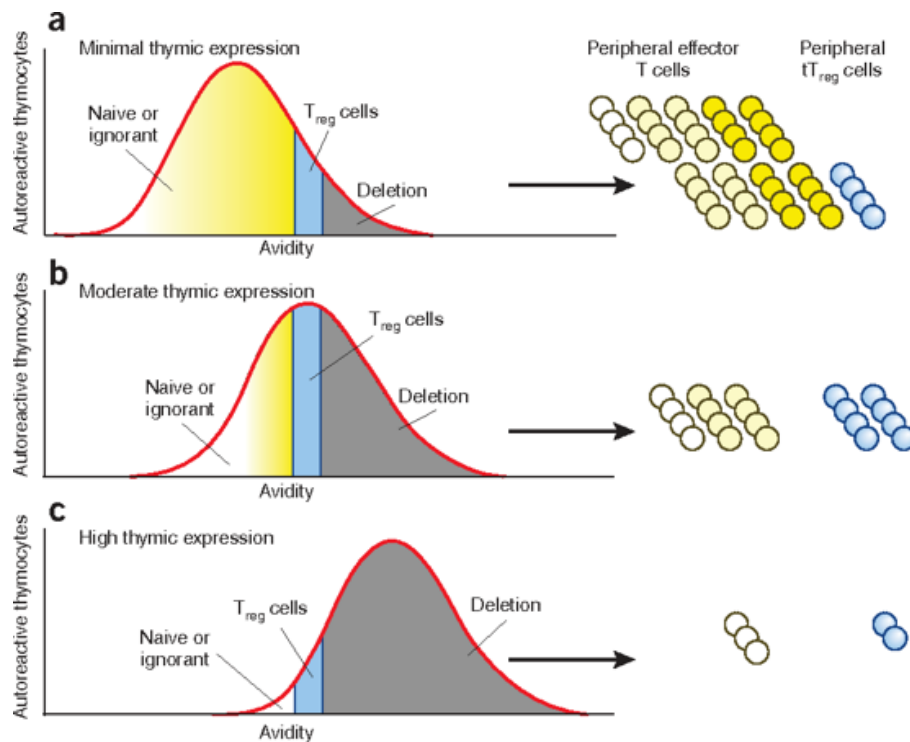


Figure 6 : Devenir des thymocytes auto-réactifs en fonction de la quantité d'antigène exprimée dans le thymus

Dans la médulla thymique, l'avidité entre le TCR et le complexe CMH/peptide du soi est dépendante du taux d'expression de la protéine du soi par les mTEC ou les DC thymiques. Les thymocytes dont l'avidité est trop importante entreront en apoptose alors que ceux dont l'avidité est modérée survivront et seront orientés vers le phénotype tTreg d'après Salomon et al., [39].

v. Anomalies des mécanismes de la tolérance centrale à l'origine d'auto-immunité

La sélection négative est essentielle dans la tolérance aux antigènes du soi. Certaines rares dérégulations des processus de tolérance centrale peuvent mener à des syndromes auto-immuns. Des mutations au sein du gène codant pour le facteur de transcription AIRE entraîne par exemple la perte de la capacité des mTEC à présenter des peptides du soi et donc un défaut majeur de la sélection négative [40]. Des souris déficientes en AIRE présentent ainsi des atteintes auto-immunes avec infiltration lymphocytaires dans différents organes, majoritairement endocriniens, nommé syndrome APECED (Polyendocrinopathie Auto-immune

de type 1) chez l'Homme [22, 41]. L'absence de AIRE entraîne donc une accumulation de lymphocytes T auto-réactifs ainsi qu'une incapacité à générer les lymphocytes tTreg [42, 43]. De même, la déficience génétique en facteur de transcription Foxp3 conduit à une perte totale des lymphocytes tTreg à l'origine du syndrome IPEX (Immune dysregulation Polyendocrinopathie Entéropathie liée à l'X) caractérisé par une hypertrophie des organes lymphoïdes secondaires et des atteintes auto immunes multiples [44].

b) Activation des lymphocytes T et tolérance périphérique

Si le processus de tolérance centrale est efficace il n'est pas total et des lymphocytes T auto-réactifs, en particulier ceux ayant une avidité faible pour les complexes CMH/peptides du soi présentés par les mTEC, peuvent échapper à la sélection négative et rejoindre la périphérie. Un deuxième niveau de tolérance dit périphérique est donc nécessaire pour empêcher l'activation des lymphocytes T auto-réactifs. De plus, la cellule dendritique responsable de l'activation des lymphocytes T matures naïfs, donc n'ayant jamais rencontrés d'antigènes, peut jouer deux rôles diamétralement opposés : l'activation des lymphocytes T pour la mise en place d'une réponse immunitaire ou le maintien de la tolérance périphérique en contrôlant l'intensité des réponses immunitaires et auto-immunes (Figure 7).

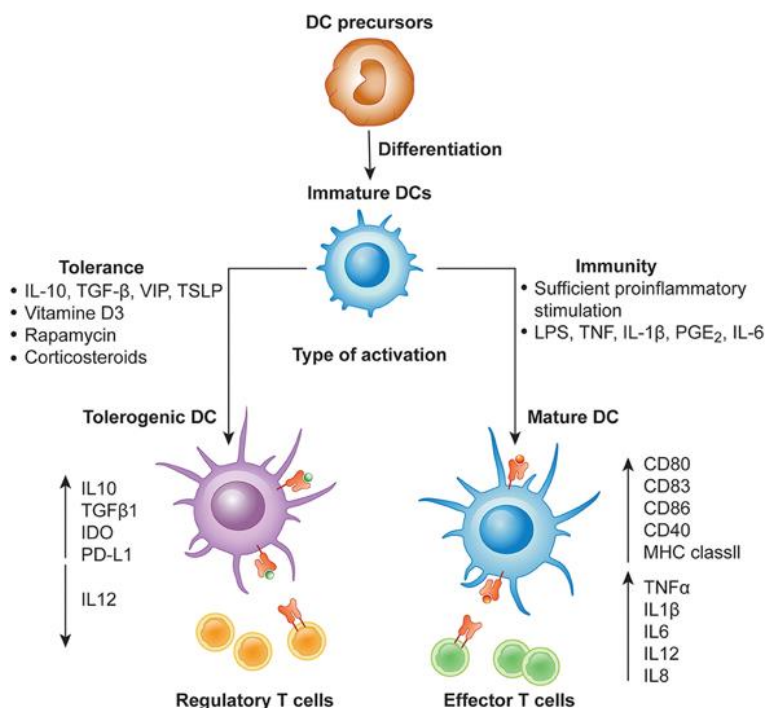


Figure 7 : Orientation des cellules dendritiques vers un phénotype tolérologène ou immunogène

Dans les tissus périphériques, les DC immatures vont pouvoir être orientés vers deux phénotypes opposés en fonction de son environnement. Dans un contexte anti-inflammatoire, les DC vont devenir tolérologènes et induire, notamment par la sécrétion de TGF- β et d'IL-10, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels en Treg. À l'inverse, dans un contexte inflammatoire la DC va devenir immunogène, exprimer les molécules de costimulation CD80/86 et CD40 et sécréter des cytokines pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 β ou IL-12 impliquées notamment dans la différenciation des lymphocytes T effecteurs d'après Bennet et al., [45].

i. *Rôle de la cellule dendritique immunogène dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T*

Au niveau du site inflammatoire, la capture d'un antigène, son apprêtement et sa présentation par la DC va entraîner sa maturation. Celle-ci est associée à une diminution des capacités d'endocytose de l'antigène et une augmentation de l'expression des molécules de classe I ou II du CMH et des molécules de costimulation B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86) [46, 47]. Au cours de leur maturation, ces DC vont également migrer vers les organes lymphoïdes secondaires en suivant, à l'aide du récepteur CCR7, le gradient de concentration des chimiokines CCL9 et CCL21 produites par les cellules stromales ganglionnaires [48, 49]. Au sein des ganglions lymphatiques, les DC matures immunogènes vont activer les lymphocytes T naïfs CD4⁺ ou CD8⁺ dont le TCR est spécifique du peptide antigénique et les orienter vers un phénotype effecteur. L'activation du lymphocyte T nécessite 2 signaux d'activation. Le premier signal est l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide antigénique (pCMH) de la cellule dendritique. Il n'est en revanche pas suffisant pour induire l'activation du lymphocyte T et conduit même à un état anergique s'il n'est pas complété par un second signal dépendant de l'activation des molécules CD28 du lymphocyte T par les molécules B7 exprimées par la cellule dendritique après capture de l'antigène (Figure 8) [50].

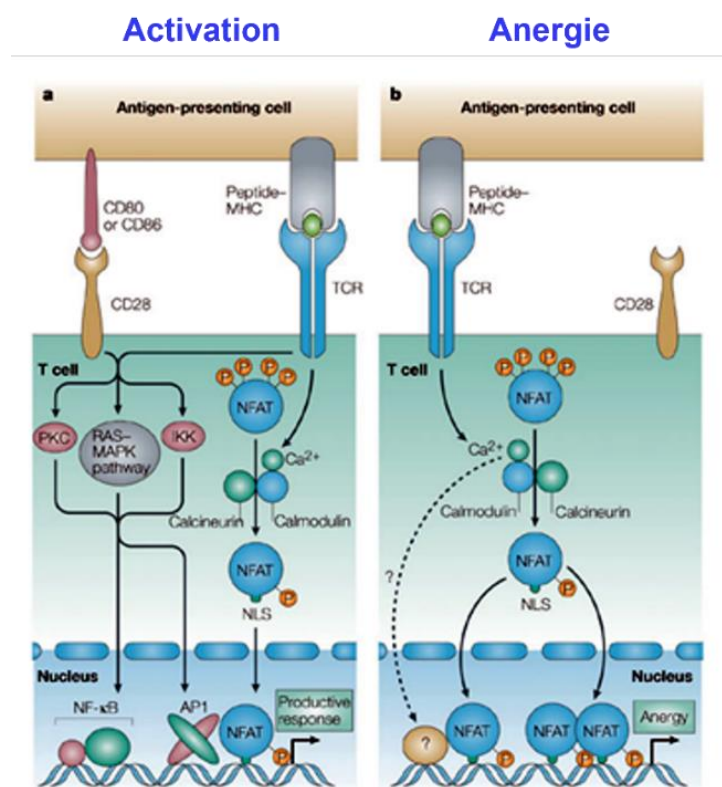


Figure 8 : Voies de signalisations menant à l'activation du lymphocyte T ou à son anergie

L'activation du TCR va induire un influx calcique au sein du lymphocyte T et la déphosphorylation activatrice du facteur de transcription NFAT. Si ce signal TCR n'est pas complété par l'activation du CD28, les facteurs de transcription AP1 et NF-κB ne seront pas activés et le lymphocyte T entrera en anergie plutôt que dans la phase d'expansion clonale. Adaptée de Jenkins et al., [51]

Cette costimulation CD28/B7 va induire l'expression du marqueur d'activation très précoce CD69 à l'origine de la dégradation du récepteur S1P₁ et donc de la rétention du lymphocyte T au sein des organes lymphoïdes secondaires. Le caractère transitoire de l'expression de CD69 permet ainsi d'assurer l'expansion clonale au sein des ganglions lymphatiques puis la migration vers les sites inflammatoires [52-54]. L'activation lymphocytaire va également induire la production d'IL-2 [55, 56] ainsi que l'expression membranaire de la chaîne α (CD25) de son récepteur de haute affinité (complexe trimérique IL-2R $\alpha\beta\gamma$) [57, 58]. Cette phase d'expansion clonale permet la constitution d'un pool de lymphocytes T dont le TCR est spécifique du complexe CMH/peptide antigénique. Enfin, la DC va sécréter différents types de cytokines en fonction de la nature de l'antigène [59, 60]. Ce troisième signal permettra la différenciation du lymphocyte T activé vers différents phénotypes effecteurs.

ii. Rôle de la cellule dendritique tolérogène dans le maintien de la tolérance périphérique

Lors de la présentation d'antigènes du soi, suite par exemple à la phagocytose d'un corps apoptotique au niveau d'un tissu, la DC immature va être orientée vers un phénotype tolérogène afin de maintenir la tolérance périphérique aux antigènes du soi [61, 62]. Les DC tolérogènes se caractérisent par une résistance à la maturation, une faible expression des molécules de classe I et II du CMH et de costimulation B7.1 et B7.2 ainsi que la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (Figures 7 et 9) [63-66]. L'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide du soi des DC tolérogènes induira l'activation du facteur de transcription NFAT. Cependant, ce signal n'étant pas associé à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 par la voie CD28/B7, le lymphocyte T auto-réactif entrera en anergie (Figure 8) [51]. D'autre part, la sécrétion des cytokines immunomodulatrices IL-10 et TGF- β associée à un signal faible ou nul de la voie CD28/B7 est impliquée dans la différenciation périphérique des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels en lymphocytes T régulateurs (pTreg) (Figures 7 et 9).

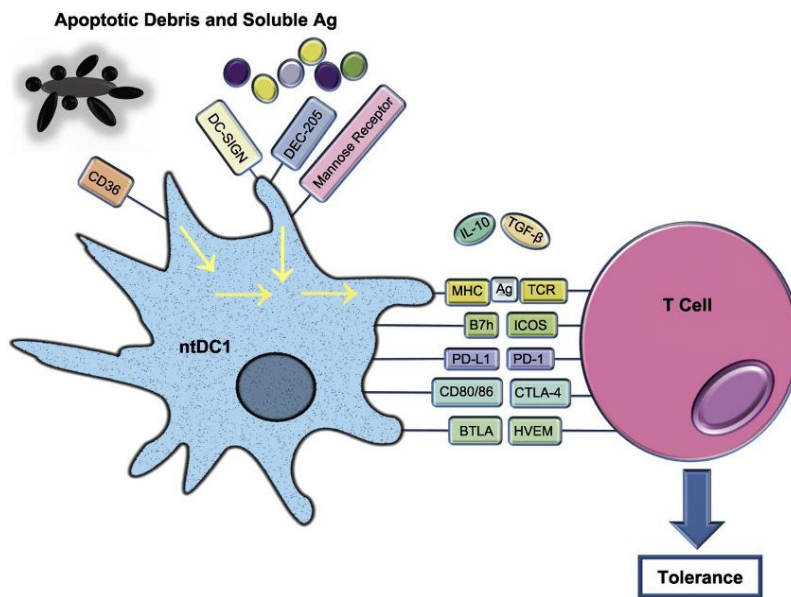


Figure 9 : Mécanisme d'orientation du lymphocyte T vers le phénotype régulateur par la DC tolérogène

L'internalisation et la présentation d'antigènes du soi par les cellules dendritiques, provenant notamment des corps apoptotiques, induit l'expression des molécules de régulation de la réponse lymphocytaire T, en particulier PD-L1, et la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) contribuant à l'orientation du lymphocyte T vers le phénotype régulateur d'après Fife et al., [67].

iii. Formation de la synapse immunologique

Au niveau membranaire, l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide antigénique va entraîner la formation d'une synapse immunologique impliquée dans l'initiation de la réponse lymphocytaire T (Figure 10) [68, 69]. L'interaction entre B7 et CD28 va potentialiser la réorganisation locale des protéines du cytosquelette pour permettre la formation de cette plateforme de signalisation qui présente une forte densité en protéines membranaires [70-72]. La partie la plus centrale de la synapse est enrichie en complexe TCR/pCMH, en co-récepteurs CD4 ou CD8 et en molécules de costimulation B7 et CD28 (Figure 10). En périphérie sont localisées la molécule d'adhérence CD44, la sialophorin CD43 permettant l'interaction de la synapse avec les protéines du cytosquelette ezrine, radixine, moesine (ERM) et la phosphatase activatrice CD45RB (RA chez l'Homme). Enfin, dans la partie intermédiaire sont retrouvées les molécules d'adhérence LFA1-ICAM impliquées dans la stabilisation de l'interaction entre le lymphocyte T et la DC ainsi que la kinase Lck responsable du signal d'activation TCR (Figure 10) [73].

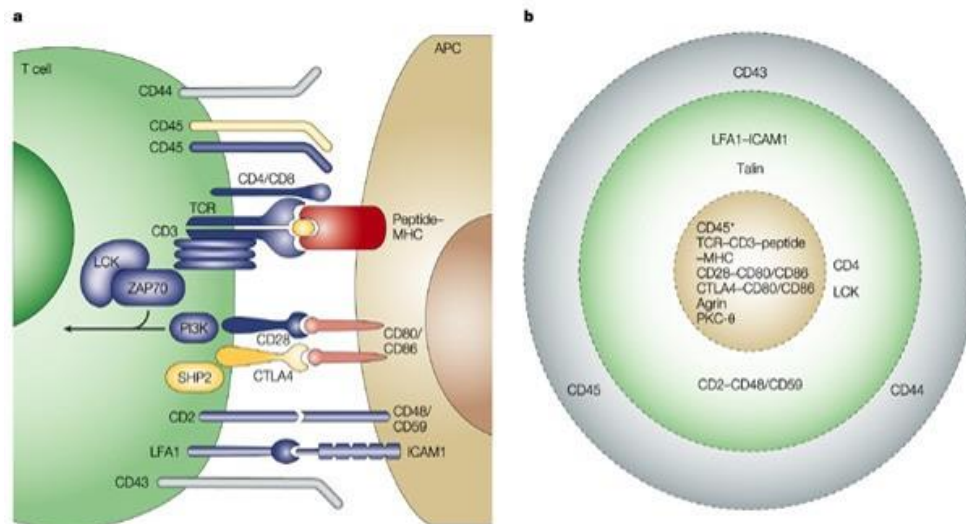


Figure 10 : Synapse immunologique et molécules de signalisation associées

La synapse immunologique se forme autour de l'interaction TCR/pCMH et CD28/B7. On retrouve également au sein de la partie la plus centrale de la synapse la molécule CTLA-4 impliquée dans la régulation de l'activation lymphocytaire ou la PKC dont le rôle est central dans la signalisation lymphocytaire. La région intermédiaire comprend la molécule CD4 de co-reconnaissance et la Lck qui lui est associée. Les molécules LFA1-ICAM1 permettant le maintien structural de la synapse immunologique sont également localisées au sein de cette zone intermédiaire. Enfin, la partie la plus périphérique de la synapse comprend la phosphatase CD45RB, la molécule d'adhérence CD44 et la sialophorin CD43 impliquée dans l'interaction avec le cytosquelette d'après Andres et al., [73].

iv. Rôle du récepteur purinergique P2X7 dans la maturation des cytokines inflammatoires

La voie P2X7/ATP est fortement impliquée dans l'immunité innée par son rôle dans la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18, IL-6 et TNF- α [74-77]. Le récepteur P2X7 des macrophages et des DC est activé par la présence d'une grande quantité d'ATP⁴⁻ extracellulaire dans le foyer inflammatoire (> 200 μ M). L'IL-1 β et l'IL-18 sont produites sous formes inactives, pro-IL-1 β et pro-IL-18, et leur maturation est dépendante de la caspase 1 responsable du clivage protéolytique de leur prodomaine. L'activation de la caspase 1 est elle-même dépendante de la stimulation du récepteur purinergique P2X7 par l'ATP⁴⁻ et de la formation d'un complexe protéique nommé inflammasome NLRP3 (Figure 11). Ainsi, l'activation de P2X7, en association avec le récepteur canal TWIK2 [78], induit un efflux potassique à l'origine d'une modification conformationnelle de la protéine NLRP3 (ou NALP3) responsable de son activation [79, 80]. NLRP3, une fois activée, va recruter la pro-caspase 1 par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice ASC. L'inflammasome NLRP3 ainsi formé va permettre le clivage activateur de la pro-caspase 1 en caspase 1 active [81]. De même, la voie P2X7/ATP⁴⁻ extracellulaire participe à la sécrétion de la forme soluble du TNF- α à travers

l'activation de la métalloprotéase ADAM 17 (ou TACE, TNF- α converting enzyme) [77, 82-84]. Enfin, la régulation de l'expression de l'IL-6 et du TNF- α par le facteur de transcription NF- κ B est contrôlée par la MAP Kinase p38 dont la phosphorylation activatrice est elle-même dépendante de l'influx calcique généré, en partie, par la voie P2X7/ATP⁴⁻ (Figure 11).

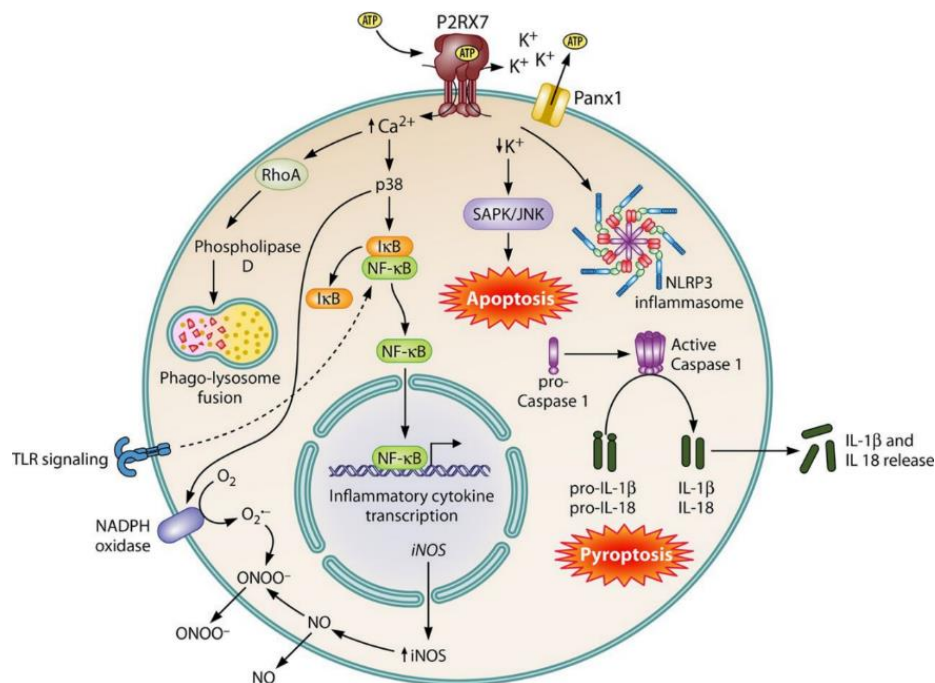


Figure 11 : Voies cellulaires de maturation des cytokines dépendantes de P2X7

L'activation de P2X7 permet le clivage activateur des cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 par la caspase 1 suite à un efflux de potassium et le recrutement de l'inflammasome NLRP3. De plus, l'influx calcique intracellulaire induit par l'ouverture du canal cationique P2X7 participe à la phosphorylation activatrice de la kinase p38 et à l'activation du facteur de transcription NF- κ B impliqué notamment dans la régulation de l'expression du gène codant pour l'IL-6 d'après Barbera-cremades et al., [85].

c) Signalisation TCR et son altération dans le lupus érythémateux disséminé

i. Signalisation par le TCR en condition physiologique

L'interaction TCR/pCMH va induire un grand nombre d'évènements moléculaires à l'origine de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T. La première étape de la transduction intracellulaire du signal TCR est la déphosphorylation activatrice, par la tyrosine phosphatase de membrane CD45RB ou (RA chez l'Homme) [86, 87], de la kinase Lck associée aux molécules CD4 ou CD8 de co-reconnaissance du CMH. La migration de la Lck déphosphorylée vers le domaine intracellulaire du TCR va permettre la phosphorylation du domaine ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) associé aux chaînes CD3 du TCR suivi du recrutement de la kinase ZAP-70 [88] et enfin de l'activation du complexe LAT (Linker Activation

T cell) par une cascade de phosphorylation. Ce complexe est composé de différentes protéines de signalisation dont la phospholipase PLC- γ responsable de l'hydrolyse du PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5 bisPhosphate) en IP₃ (Inositol triPhosphate) et DAG (DiAcyl Glycerol). La voie de signalisation IP₃, à l'origine d'un relargage de calcium (Ca²⁺) du réticulum endoplasmique, permet l'influx calcique extracellulaire appelé SOCE (Store Operated Calcium Entry) et la déphosphorylation activatrice du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cell) par la phosphatase calcineurine [89-91]. La voie DAG va permettre, en activant d'autres protéines de transduction telles que PKC et RAS, l'activation des MAP Kinases JNK et ERK1/2 et la dégradation d'I κ B à l'origine, respectivement, de l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B [92] (Figure 12). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire notamment par la production d'IL-2 et l'expression de son récepteur de haute affinité [93].

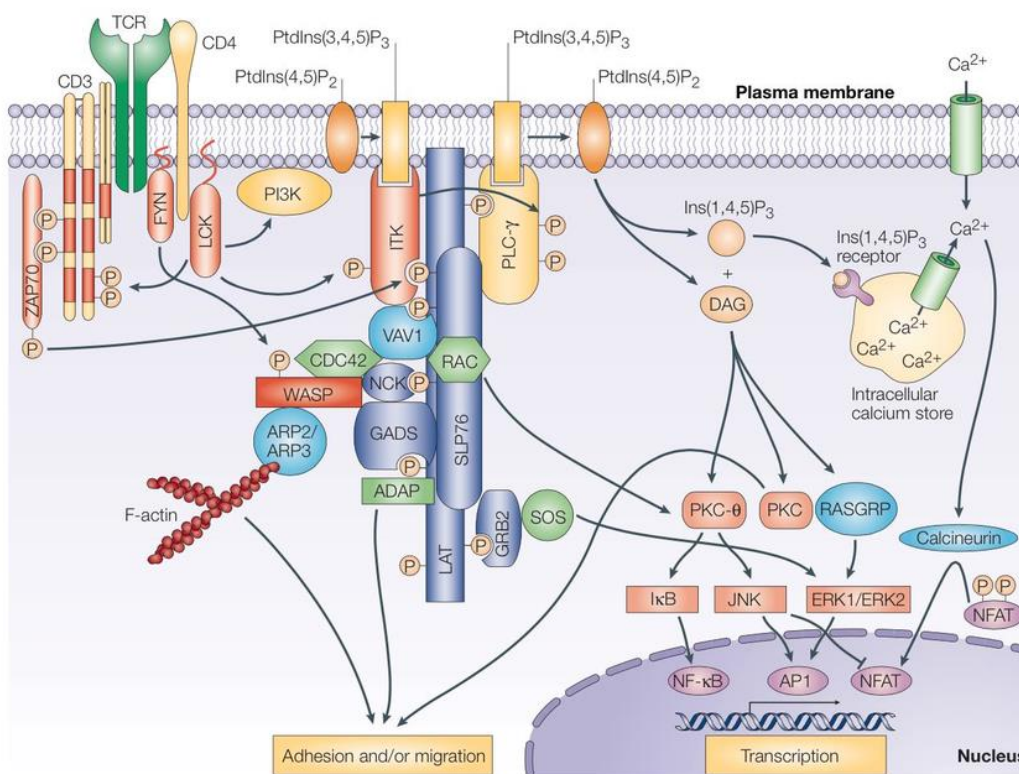


Figure 12 : Voies de signalisations associées à l'activation du TCR

L'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide va initier différentes voies de signalisation qui vont mener à l'activation et la translocation au noyau des facteurs de transcription NF- κ B, AP1 et NFAT impliqués dans l'activation du lymphocyte T et l'induction de l'expansion clonale notamment par l'expression de l'IL-2 d'après Feske et al., [94].

La stimulation de CD28 va induire l'activation de la PI3 Kinase et de la kinase Akt augmentant ainsi la translocation de NF- κ B au noyau et la production de la protéine anti-apoptotique Bcl-xl [95-97]. Akt est également un inhibiteur du facteur de transcription p53 impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, la voie Akt permet d'augmenter l'adressage au noyau du facteur NFAT [98, 99] et le transport de glucose dans la cellule [100]. La double signalisation TCR/pCMH et CD28/B7 va donc permettre, par diverses voies cellulaires, d'induire la survie et l'expansion clonale du lymphocyte T activé [101] (Figure 13). À l'inverse, l'activation du lymphocyte T induit également l'expression membranaire de la molécule CTLA-4, un récepteur de haute affinité pour les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) de la CPA [102]. CTLA-4 joue un rôle de régulateur négatif de l'activation et de la prolifération du lymphocyte T en inhibant par compétition la capacité d'interaction de CD28 avec B7. En conséquence, il altère la dynamique membranaire du lymphocyte T au niveau des radeaux lipidiques et de la synapse immunologique [103-105] ainsi que la voie de signalisation PI3K/Akt [106]. Le rôle inhibiteur de CTLA-4 a été démontré par l'utilisation de souris rendues génétiquement déficientes. Ces souris KO présentent une expansion clonale massive de lymphocytes T effecteurs (CD69⁺CD44^{hi}CD62L^{low}) responsable d'une mort prématurée vers l'âge de 2 à 3 semaines due à une auto-immunité systémique [107, 108].

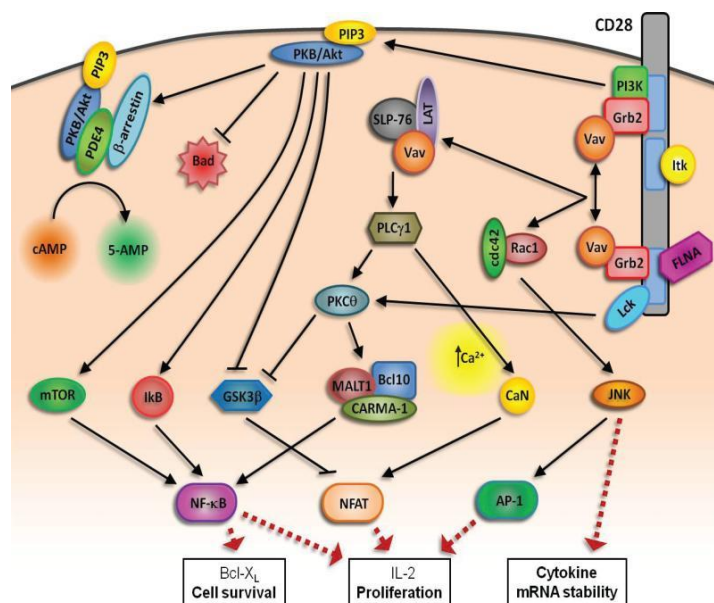


Figure 13 : Voies de signalisation intracellulaire associées à la molécule de costimulation CD28

Pour proliférer, le lymphocyte T nécessite l'activation du récepteur CD28 en plus de la signalisation TCR. À travers différentes voies de signalisation, l'activation de CD28 va augmenter celle de NF- κ B, AP1 et NFAT afin de potentialiser l'activation du lymphocyte T d'après Marinari et al., [101]

ii. *Altération de la signalisation TCR dans le lupus érythémateux disséminé*

Chez les patients lupiques ainsi que dans les lignées de souris modèles, les lymphocytes T présentent une dérégulation de leur signalisation menant à de l'auto activation. Le taux d'expression de la chaîne ζ du CD3 est réduit et remplacé par la chaîne γ du récepteur aux fragments Fc des IgG (Fc γ R) [109-111]. Cette substitution entraîne une modification du recrutement des partenaires de signalisation avec un remplacement de la protéine ZAP-70 par la kinase Syk impliquée, en conditions physiologiques, dans la signalisation BCR. L'interaction entre Fc γ R et Syk étant beaucoup plus affine que celle entre CD3 ζ et ZAP-70, il en résulte un influx calcique de plus forte intensité [112, 113] entraînant l'activation de la calmodulin kinase IV (CaMK IV) et une réduction de la production d'IL-2 [114, 115] (Figure 14). Une déficience en CaMK IV induite chez la souris lupique MRL/lpr permet d'ailleurs une restauration des taux physiologiques d'IL-2 [116]. L'activation inappropriée de Syk et de CaMK IV induit également une augmentation d'activation de la voie PI3K-Akt-mTORC1 à l'origine d'une synthèse accrue d'IL-17 suite à l'activation du facteur de transcription ROR γ t [117, 118]. Chez les patients lupiques, le taux d'IL-17 est également influencé par la suractivation de la voie ROCK qui régule également la migration des lymphocytes T effecteurs à travers la phosphorylation des protéines ERM du cytosquelette et participe aux infiltrats lymphocytaires dans les tissus de patients lupiques [119-122].

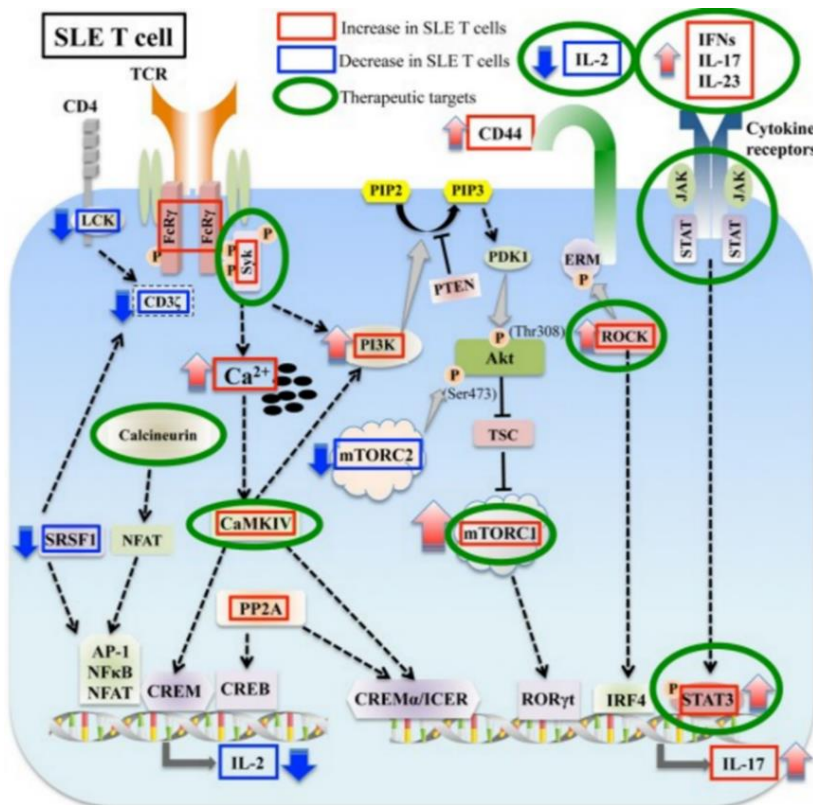


Figure 14: Altérations des voies de signalisation du lymphocyte T au cours du LED

Dans les lymphocytes T de patients lupiques ou de souris modèles MRL/lpr, la voie Syk se substitue à la voie Lck entrainant une augmentation de l'influx calcique et de l'activation de la PI3K aboutissant à une diminution de la production d'IL-2 et une augmentation de la production d'IL-17 d'après Katsuyama et al, [123]

L'altération de ces voies de signalisation ne suffit cependant pas à expliquer l'ensemble des dérégulations observées dans les lymphocytes T de patients lupiques. La kinase Lck (Figure 14) illustre la complexité de l'étude des anomalies de signalisation observées dans les lymphocytes T pathologiques du fait de son rôle central dans des processus aussi opposés que la potentialisation du signal TCR et le maintien du lymphocyte T dans un état quiescent. En effet, la régulation de l'activité de cette protéine est complexe car dépendante de son activation par la tyrosine phosphatase de membrane CD45RB ou RA mais également par sa localisation dans ou hors les radeaux lipidiques qui sont des domaines membranaires enrichis en cholestérol [124-126].

d) Influence des domaines membranaires de signalisation dans l'auto-immunité

Les lymphocytes T des patients lupiques présentent une redistribution de certaines protéines de signalisation à leur membrane, notamment le FcγR et la kinase Syk, que l'on retrouve anormalement activées dans les lymphocytes T pathologiques. La clusterisation des TCR en réponse à une activation est également plus rapide. La réorganisation des domaines membranaires de signalisation est une des hypothèses permettant d'expliquer l'augmentation des signaux intracellulaires des lymphocytes T des patients lupiques. Ces lymphocytes T

pathologiques présentent en effet une capacité de synthèse et un taux basal augmentés en gangliosides GM1, un composant majeur des radeaux lipidiques.

i. Plateformes membranaires de signalisation

L'existence ou la nature des radeaux lipidiques (lipid rafts) sont toujours sujets de débats du fait de leur complexité biochimique, même si, de nouveaux outils d'analyse ont permis de mieux définir, au fil des années, ces domaines membranaires dynamiques. La première technique ayant permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des membranes plasmiques a été l'utilisation de détergents non ioniques permettant l'obtention de deux types de fractions membranaires de composition clairement distincte appelées DRM (detergent resistant membrane) et non-DRM [127, 128]. Les DRM, correspondant aux radeaux lipidiques, présentent un très fort taux en cholestérol, sphingolipides, gangliosides GM1 et protéines à ancre GPI comparés aux fractions non-DRM [129, 130]. Cette technique présente cependant des limites. Ainsi, la composition des DRM est fortement influencée par la température et surtout le type de détergent utilisé [128, 131]. D'autres outils ont ensuite été développés, notamment des techniques de microscopie haute résolution telles que le STED (stimulated emission depletion) associées à l'utilisation de sondes marquées tels que la sous-unité B de la cholera toxine (CTB) spécifique des gangliosides GM1 majoritairement présents au sein des radeaux lipidiques ou des sondes capables de s'intégrer au sein de domaines spécifiques des membranes plasmiques comme des analogues fluorescents du cholestérol [132-134]. Enfin, des agents impactant l'intégrité des radeaux lipidiques ont également été utilisés comme la méthyl- β -cyclodextrine qui permet d'extraire le cholestérol de la membrane [135-137]. L'ensemble de ces techniques, malgré leurs limitations individuelles, ont permis de mieux définir ces microdomaines membranaires complexes enrichis en cholestérol qui représentent la majeure partie de la membrane plasmique. Leur répartition membranaire est cependant très fortement sujette à modification en réponse à l'activation cellulaire ou au trafic membranaire (Figure 15). Il est important de noter que les gangliosides GM1 qui sont très fortement présent au sein des radeaux lipidiques et sont souvent utilisés comme marqueur de ces domaines membranaires, exercent à la fois une influence structurale et sur la signalisation associée aux protéines de membrane [138]. En effet, les gangliosides GM1, les plus étudiés des gangliosides sont majoritairement localisés à la bicouche externe de la membrane plasmique où ils interagissent préférentiellement avec le cholestérol, les sphingolipides et de nombreuses

protéines transmembranaires notamment à ancre GPI [139]. Ils sont également impliqués dans la signalisation de nombreux récepteurs et dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion, l'homéostasie du calcium ou la prolifération et la différenciation [140]. Les gangliosides GM1 étant très fortement exprimé dans le système nerveux central, ils sont particulièrement étudiés dans des syndromes tels que la gangliosidose, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington. De façon intéressante, ils participent également à la sensibilité à l'insuline et aux diabète [141]. De plus, les taux de GM1 membranaires des lymphocytes T CD4⁺ de patients lupiques sont augmentés par rapport aux sujets sains, ce qui suggère une influence de ces gangliosides dans le développement de l'auto-immunité [142]. À l'inverse, des souris rendues déficientes pour l'ensemble des gangliosides présentent une diminution de la prolifération des lymphocytes T en réponse à une stimulation par l'IL-2 et ainsi une diminution du nombre de lymphocytes T et de la taille des organes lymphoïdes secondaires [143]. Les mécanismes responsables de ces fonctions immunitaires restent cependant peu étudiés.

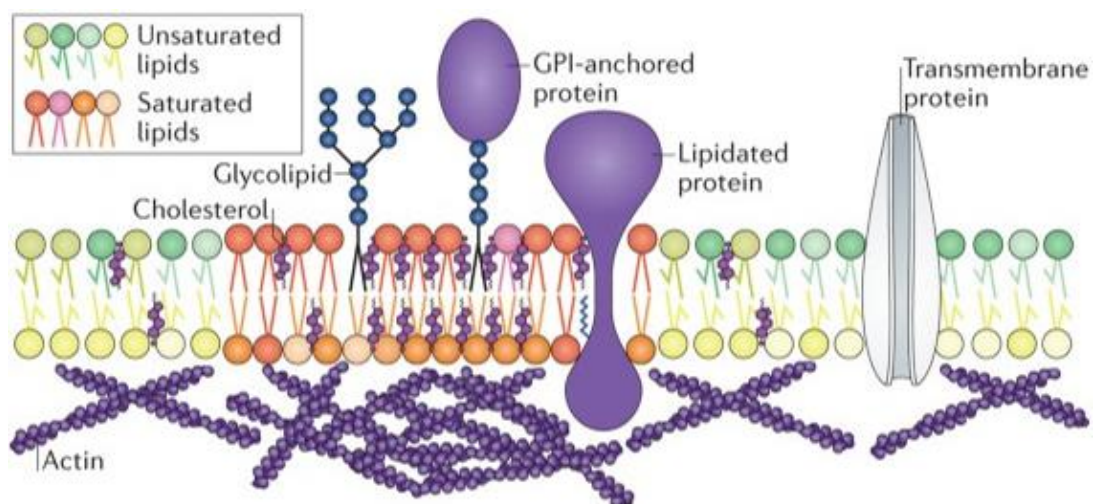


Figure 15 : Structure d'un radeau lipidique membranaire

Le cholestérol permet la formation d'un radeau lipidique en interagissant préférentiellement avec les domaines membranaires enrichis en lipides saturés ce qui permet l'intégration de protéines lipidées (par exemple palmitoylées) ou à ancre GPI et la formation de plateformes privilégiées de signalisation cellulaire. Adaptée de Sezgin et al., [144].

Les domaines dynamiques enrichis en cholestérol contiennent également de nombreuses protéines membranaires et transmembranaires qui jouent un rôle d'organisateur de la membrane en plus de leurs fonctions cellulaires [145-148]. Environ 35% des protéines de la membrane plasmique sont retrouvées au sein des radeaux lipidiques dont une forte proportion de protéines associées à une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) ou bien palmitoylées, deux types de lipidations post-traductionnelles connues pour interagir préférentiellement avec les domaines membranaires enrichis en cholestérol. Cependant, près d'un tiers des protéines associées aux radeaux lipidiques ne présentent pas ces caractéristiques de lipidation. Le mécanisme sous-jacent à cette localisation membranaire reste mal défini même si la longueur des domaines transmembranaires (TMD) influe sur la localisation protéique à la membrane [149, 150]. Les protéines présentant un TMD de grandes tailles ont en effet une plus forte propension à se localiser dans les radeaux lipidiques qui sont des domaines membranaires plus épais. De plus, ces microdomaines permettent la ségrégation à la membrane d'éléments spécifiques régulant les interactions protéiques, les oligomérisations ou la conformation de certaines protéines [151] faisant des radeaux lipidiques des plateformes privilégiées de signalisation membranaire. La dérégulation de l'homéostasie du cholestérol peut entraîner des modifications importantes de l'organisation des radeaux lipidiques. Une trop forte concentration en cholestérol libre intracellulaire sera en partie compensée par son intégration à la membrane plasmique afin de réduire sa toxicité cellulaire, cependant, cela conduira à une augmentation de la proportion de radeaux lipidiques pouvant mener à des dérégulations pathologiques au cours du temps [152] (Figure 16).

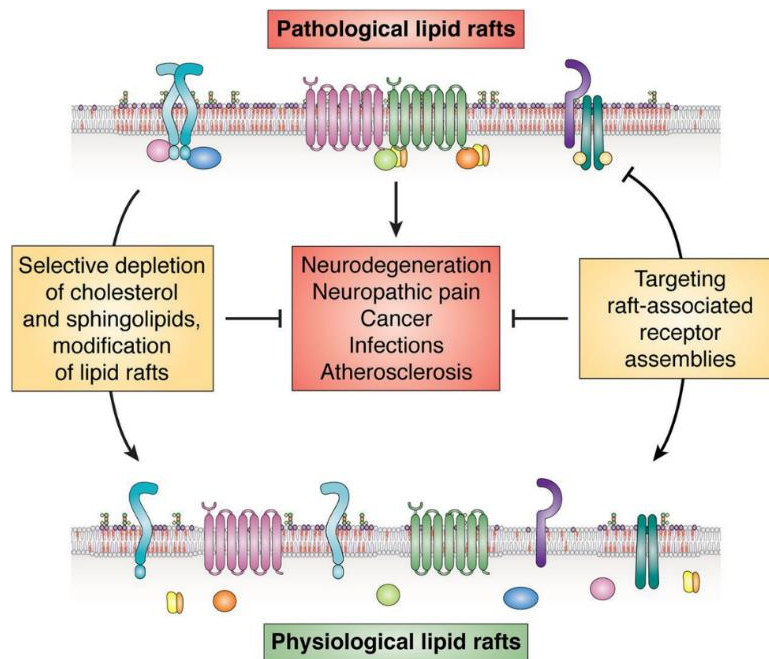


Figure 16 : Conséquence d'une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol sur la formation des radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des plateformes privilégiées de signalisation cellulaire du fait de leur capacité à regrouper des protéines membranaires et à réguler leurs interactions. Du fait de leur sensibilité au taux de cholestérol membranaire, une augmentation de celui-ci peut mener à une sur-agrégation des radeaux lipidiques et à une situation pathologique d'après Sviridov et al., [152].

ii. Influence des radeaux lipidiques sur la signalisation TCR

L'activation du lymphocyte T par l'antigène entraîne une redistribution des protéines membranaires avec notamment une forte augmentation du taux de TCR au sein des radeaux lipidiques [153]. La protéine adaptatrice LAT, le corécepteur CD4 et la protéine ZAP-70 de la signalisation TCR sont à l'inverse retrouvées constitutivement au sein des radeaux [154-156]. D'autre part, les protéines Lck qui présentent la capacité à entrer ou sortir des radeaux lipidiques sont retrouvées dans une proportion d'environ 50% au sein des microdomaines enrichis en cholestérol. Lorsque la capacité d'intégration de Lck dans les radeaux lipidiques est réduite ou inhibée, la signalisation TCR est très fortement réduite suggérant une implication majeure des radeaux lipidiques dans la localisation et la fonctionnalité de la voie Lck/TCR [157-159]. Deux modèles sont discutés quant aux conséquences de l'activation du lymphocyte T sur la localisation du TCR au sein des radeaux lipidiques. Un premier modèle suggère que l'activation induit le recrutement du TCR au sein des radeaux lipidiques où il va interagir avec Lck et mettre en place la signalisation intracellulaire [160, 161]. Le deuxième modèle considère

que les TCR sont toujours localisés au sein des radeaux lipidiques mais que ces derniers sont plus éparés à la membrane [162-164]. L'agrégation des radeaux lipidiques au sein de la synapse immunologique est essentielle à la transduction efficace des signaux d'activation dépendant du TCR. La voie CD28/B7 est essentielle pour cette agrégation massive des radeaux lipidiques qui est à l'origine d'une très forte augmentation de la densité membranaire en TCR [153, 165]. La partie intracellulaire de CD28 se lie à la filamine A et au facteur d'échange des nucléotides Vav1 qui est un régulateur de l'activité de la Rho-GTPase cdc42, de la protéine WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) et du complexe protéique ARP2/3 responsable de la polymérisation des filaments d'actine au sein de la synapse immunologique (Figure 14). Vav1 recrute également à la synapse la kinase phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP5K) qui est essentielle au recrutement de la filamine A, à la production de PIP₂ impliqué dans le recrutement de WASP et au maintien de la polymérisation de l'actine. L'ensemble de ces interactions moléculaires permettent la réorganisation du cytosquelette et l'agrégation des radeaux lipidiques au sein de la synapse immunologique (Figure 17) [70, 71].

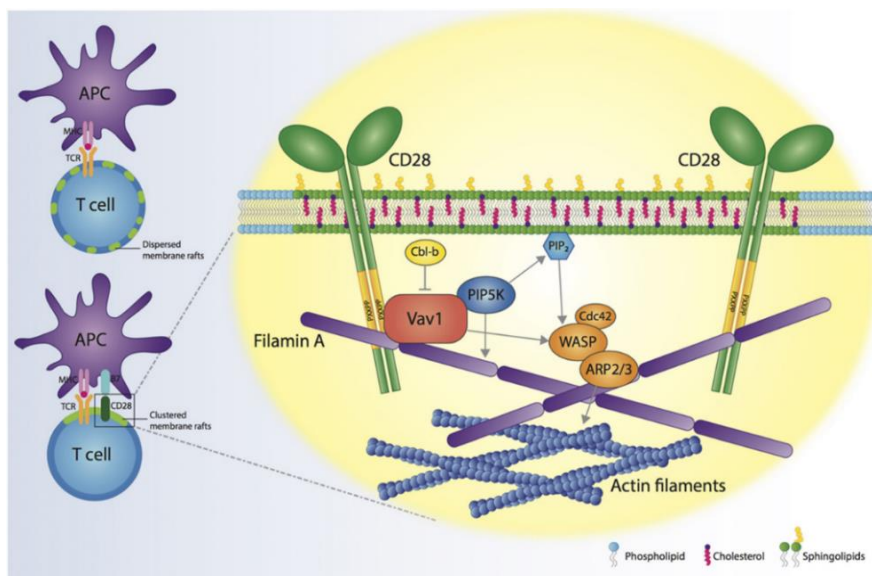


Figure 17 : Rôle de CD28 dans la formation des radeaux lipidiques et de la synapse immunologique

L'activation de CD28 permet d'augmenter et de maintenir l'agrégation des radeaux lipidiques afin de soutenir la formation de la synapse immunologique. Ainsi l'adaptateur Vav1 et le complexe formé des protéines WASP, Cdc42 et ARP2/3 associé à la filamine A et aux réseaux d'actine, vont remodeler la membrane plasmique de façon à créer une large plateforme de signalisation enrichie en cholestérol et en sphingolipides, d'après Zumerle et al., [163].

La régulation du cholestérol membranaire et de son métabolisme sont essentielles pour la signalisation TCR au niveau des radeaux lipidiques et donc l'expansion clonale des lymphocytes T. De fait, une dérégulation du métabolisme du cholestérol est responsable d'altérations très

importantes de la signalisation des lymphocytes T ainsi que du pool des différents sous-types de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺. En plus de son rôle d'organisateur des radeaux lipidiques, le cholestérol membranaire exerce également un rôle inhibiteur sur la signalisation du TCR en le maintenant dans une conformation inactive par une interaction directe avec sa chaîne β [166, 167]. D'ailleurs, une déplétion en cholestérol membranaire entraîne une accumulation de TCR en conformation active responsable de signaux d'activation spontanés [137, 156]. Paradoxalement, les lymphocytes T de patients lupiques et de souris modèles MRL/lpr présentent une auto-activation TCR bien que présentant un taux élevé de cholestérol membranaires et de radeaux lipidiques [168, 169]. De plus, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ cultivés dans un milieu délipidé présentent une plus faible activation des voies de signalisation en réponse à une activation du TCR mais également une diminution de leur capacité proliférative [170]. Une réduction de la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à estérifier le cholestérol, par perte de fonction de l'enzyme ACAT1, entraîne une augmentation massive du taux de cholestérol membranaire, notamment au sein des radeaux lipidiques, une augmentation de la capacité d'activation de prolifération de ces lymphocytes T et une potentialisation de leur activité cytotoxique [171]. En résumé, le cholestérol est un régulateur très important de la signalisation TCR par sa capacité à interagir directement avec la chaîne β du TCR et à organiser les radeaux lipidiques qui sont essentiels à l'activation du lymphocyte T et donc à son expansion clonale.

e) Expansion clonale des lymphocytes T

La résultante de l'activation par la voie TCR/pCMH est l'expansion clonale du lymphocyte T afin de constituer un pool de lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène. Les signaux induits par les voies de signalisation TCR/pCMH et CD28/B7 vont conduire à une synthèse et une sécrétion autocrine d'IL-2 et à l'expression de la chaîne α (CD25) du récepteur à l'IL-2 (IL-2R $\beta\gamma$) ce qui augmente drastiquement l'affinité de ce récepteur pour son ligand, la valeur du Kd passe de 10^{-9} à 10^{-11} M [172]. L'activation du IL-2R $\alpha\beta\gamma$ par l'IL-2 va permettre 10 à 20 cycles de divisions cellulaires aboutissant à une multiplication par au moins 10^4 à 10^5 du nombre de lymphocytes T spécifiques d'antigène selon le phénotype CD4⁺ ou CD8⁺. L'expansion clonale du lymphocyte T fonctionne sur le principe d'une boucle autocrine d'autorégulation. Alors que la voie CD28/B7 potentialise la synthèse d'IL-2, la fixation de l'IL-2 sur son récepteur va

entraîner l'inhibition de la transcription de son gène par phosphorylation activatrice de la kinase Stat 5 [173]. Après environ 48h de prolifération, la signalisation IL-2R $\alpha\beta\gamma$ /Stat 5 va prendre le dessus sur la voie CD28/B7 et la synthèse d'IL-2 va être stoppée. Parallèlement, la voie inhibitrice CTLA-4/B7 va réduire la production d'IL-2 et donc l'expansion clonale à la fois par compétition avec l'interaction CD28/B7 et par inhibition de la PI3K [174].

i. Modification du taux de cholestérol membranaire en réponse à l'activation du lymphocyte T

L'activation du lymphocyte T s'accompagne de modifications très importantes du métabolisme cellulaire notamment celui du cholestérol. En effet, le lymphocyte T activé devient hyperprolifératif et va donc augmenter sa synthèse de cholestérol afin de soutenir la formation de nouvelles membranes [175]. Le signal TCR va activer la sulfotransférase 2B1 (SULT2B1) responsable du piégeage et de la sulfatation des oxystérols [176]. Les oxystérols sulfatés peuvent alors être pris en charge par le transporteur ABCG1 afin de réduire leur concentration intracellulaire et ainsi inhiber et activer respectivement les facteurs LXR β et SREBP [177-179]. La synthèse du transporteur ABCG1 va donc être stoppée, réduisant ainsi l'efflux de cholestérol. À l'inverse, la HMG-Coa réductase ainsi que les récepteurs aux LDL vont être plus fortement produits afin d'augmenter la synthèse *de novo* mais aussi l'influx de cholestérol. Cette augmentation massive du taux de cholestérol intracellulaire va ainsi soutenir la biogénèse des membranes cellulaires nécessaire à la prolifération du lymphocyte T (Figure 18) [176]. Il est intéressant de noter qu'une altération de la régulation du métabolisme du cholestérol par LXR peut mener à une prolifération lymphocytaire non contrôlée entraînant une splénomégalie [180].

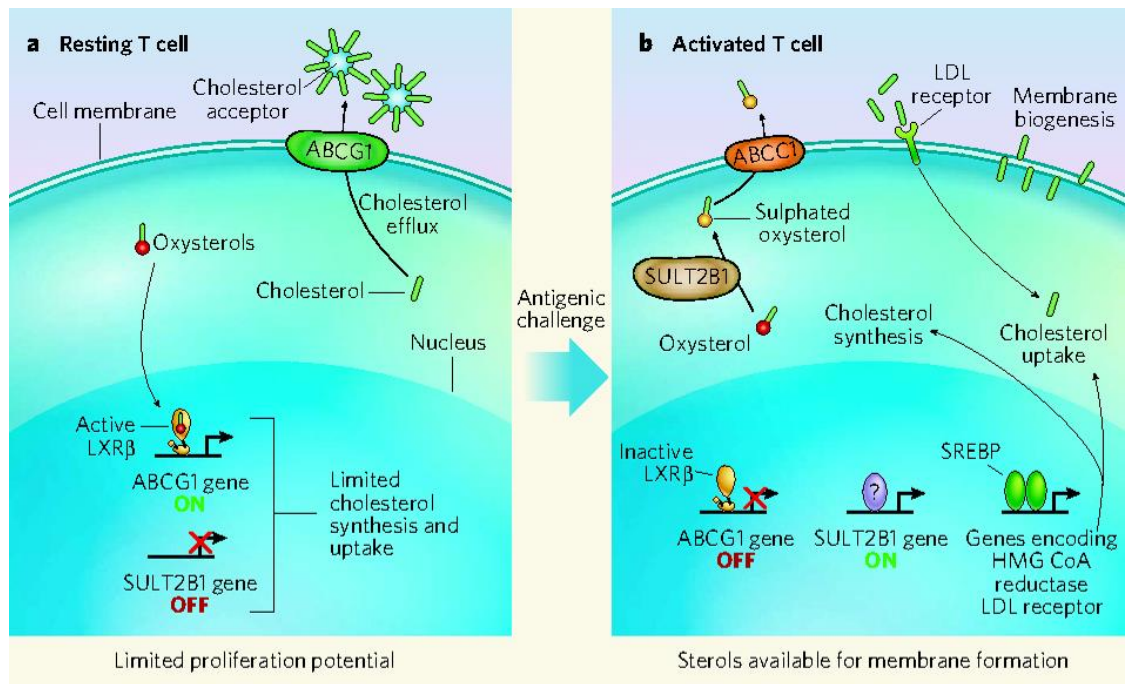


Figure 18 : Effet de l'activation du lymphocyte T sur le métabolisme du cholestérol

L'expansion clonale du lymphocyte T nécessite une augmentation du taux de cholestérol de façon à pouvoir soutenir la biogenèse des membranes. Ainsi, le lymphocyte T activé va éliminer ses oxystérols via l'activité de la SULT2B1 ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse du transporteur ABCG1 responsable de l'export de cholestérol et l'augmentation de la production d'HMG-CoA réductase et des LDLR responsables respectivement du métabolisme et de l'import de cholestérol, d'après Glass et al., [176].

f) Différentiation et fonction des lymphocytes T effecteurs

Suite à leur activation et expansion clonale, les lymphocytes T vont se différencier en lymphocytes T effecteurs de différents phénotypes en fonction de la nature de l'antigène et du type de cytokines sécrétée par les DC. Ces changements phénotypiques sont accompagnés de l'expression de différentes molécules permettant leur spécialisation en lymphocytes T CD4⁺ helper et en lymphocytes T cytotoxiques. Une des modifications majeures relatives aux lymphocytes T effecteurs est leur capacité à répondre à l'antigène sans nécessité de costimulation par la voie CD28/B7. Par exemple, l'activité cytotoxique d'un lymphocyte T CD8⁺ dépend exclusivement de l'interaction TCR/pCMH. Les lymphocytes T effecteurs présentent également des modifications du type de protéines exprimées à leur membrane par rapport à un lymphocyte T naïf ou récemment activé. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ activés vont réduire l'expression membranaire de la phosphatase CD45RB et de la molécule de homing L-selectine (CD62L) et augmenter celle de la molécule d'adhérence CD44. Ces changements moléculaires vont permettre aux cellules activées de quitter les organes lymphoïdes secondaires et de

rejoindre, par la circulation sanguine, les sites inflammatoires. L'expression de CD40L par les lymphocytes Th leur permettra de réactiver les macrophages inflammatoires ou les lymphocytes B présentant un antigène par activation de leur récepteurs CD40.

i. Lymphocytes T helper

À l'issue de leur activation par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4⁺ vont se différencier en lymphocytes T helper dont le phénotype dépendra de l'environnement cytokinique, de l'affinité du TCR pour le complexe CMH/peptide antigénique, de la quantité d'antigène et de sa nature et enfin de l'activation de leurs récepteurs Notch par leurs ligands exprimés par la DC [181-183] (Figure 19 et 20).

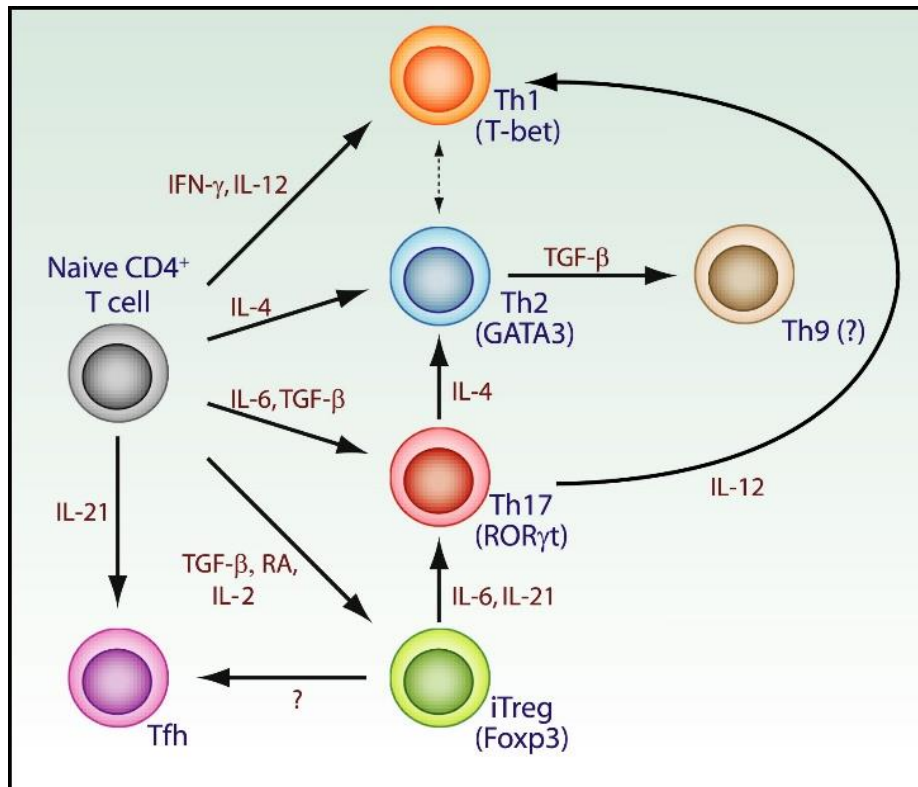


Figure 19 : Types de lymphocytes T effecteurs et les signaux cytokiniques associés à leur différenciation

L'orientation du lymphocyte T naïf vers les différents phénotypes effecteurs dépend du signal TCR et des cytokines présentes lors de son activation. L'orientation vers le phénotype Th1 ou Th2 dépend respectivement des cytokines IFN-γ/IL-12 ou IL-4. La présence d'IL-21 oriente plutôt vers le phénotype Tfh. Cette orientation dépend de balances cytokiniques complexes puisque la costimulation par les cytokines TGF-β et IL-6 induit un phénotype Th17 alors que celle par les cytokines TGF-β et IL-2 oriente plutôt le lymphocyte vers la voie Treg. Un phénotype effecteur acquis n'est pas immuable puisqu'il existe une plasticité permettant la reprogrammation des Th vers d'autres phénotypes effecteurs en fonction du contexte cytokinique, d'après Lezzi et al., [181].

Lymphocytes Th1

Dans le cas d'une infection bactérienne ou virale les lymphocytes T CD4⁺ vont se différencier en lymphocytes Th1 caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet. Cette orientation phénotypique est dépendante d'un fort signal TCR [184], d'un environnement cytokinique riche en interféron γ (IFN- γ) produit par les cellules NK et en IL-12 produit par les DC immunogènes [185, 186] et l'activation du récepteur Notch 3 des lymphocytes T CD4⁺ par son ligand Delta Like 1 ou 4 (DLL 1 ou 4) exprimé à la membrane des DC (Figure 19 et 20). La fixation de l'IFN- γ et de l'IL-12 sur leur récepteur spécifique des lymphocytes T CD4⁺ va activer respectivement les kinases STAT 1 et STAT 4 [187, 188] impliquées dans l'expression du facteur T-bet lui-même responsable de l'expression des gènes codant pour l'IFN- γ et la chaîne $\beta 2$ du récepteur de haute affinité à l'IL-12 (IL-12R $\beta 1\beta 2$) [189-191]. Ces lymphocytes Th1 sont spécialisés dans la réponse immunitaire aux agents pathogènes à développement intracellulaire. Ils vont, via la synthèse d'IFN- γ , activer les macrophages inflammatoires pour induire de nouvelles capacités microbicides et potentialiser l'expression membranaire des molécules du CMH [192-196]. De plus, l'interaction Th1-lymphocyte B va induire la commutation vers des sous classes d'IgG fixant le complément permettant ainsi la lyse bactérienne ou l'opsonisation pour favoriser la phagocytose des agents pathogènes [197-199].

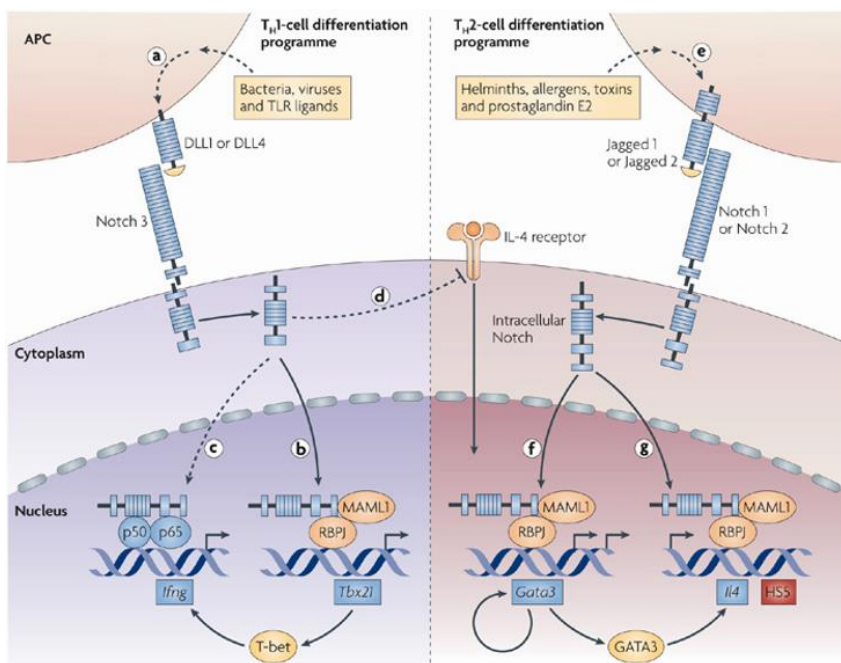


Figure 20 : Voies Notch impliquées dans l'orientation vers un phénotype effecteur Th1 ou Th2

L'expression de différents isoformes du récepteur Notch par les lymphocytes T ainsi que l'expression des ligands DLL1/4 ou Jagged 1/2 par les DC va orienter le lymphocyte T naïf vers un phénotype activé de type Th1 (voie Notch3/DLL1 ou 4) ou de type Th2 (voie Notch 1 ou 2/Jagged 1 ou 2), d'après Amsen et al., [200].

Lymphocytes Th2

Dans le cas d'une infection parasitaire, les lymphocytes T CD4⁺ vont être orientés vers le phénotype Th2 par un signal TCR plus modéré que dans le cas de l'orientation vers le phénotype Th1, un environnement cytokinique riche en IL-4 et l'activation des récepteurs Notch 1 et 2 des lymphocytes T CD4⁺ par leurs ligands Jagged 1 et 2 exprimés à la membrane de la DC (Figure 20). Les sources d'IL-4 sont multiples puisqu'elles peuvent provenir des cellules NK T, des mastocytes ou des basophiles [201, 202]. Ces différents signaux sont responsables, à travers la phosphorylation activatrice de STAT 6, de l'expression du facteur de transcription GATA-3 lui-même responsable de la synthèse des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 [203-205]. GATA-3 régule également sa propre expression ce qui permet le maintien du phénotype Th2. Les lymphocytes Th2 sont spécialisés dans l'élimination des agents pathogènes à développement extracellulaires. Ils vont permettre, par la sécrétion d'IL-4, la commutation isotypique vers des IgE et des sous classes d'IgG ne fixant pas le complément (IgG4 chez l'Homme et IgG1 chez la souris) (Figure 22). De plus, les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13, vont permettre le recrutement et l'activation des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes. Enfin, la reconnaissance des complexe antigènes-anticorps par les récepteurs Fcγ1R ou Fcγ4R (selon l'espèce) et FcεR de ces cellules immunitaires vont entraîner la dégranulation de leurs molécules cytotoxiques et la destruction des pathogènes extracellulaires.

Lymphocytes Th17

Les Th17 sont impliqués dans l'immunité des muqueuses contre les bactéries extracellulaires et les champignons. L'orientation des lymphocytes T CD4⁺ activés vers le phénotype Th17 est dépendant d'un environnement riche à la fois en cytokines immunosuppressives TGF-β et pro-inflammatoires IL-6 [206, 207]. En réponse aux signaux cytokiniques, les lymphocytes Th17, qui présentent constitutivement la chaîne commune β1 des récepteurs à l'IL-12 et à l'IL-23, vont exprimer préférentiellement la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-23 (IL-23R/IL-12Rβ1) plutôt que la chaîne β2 du récepteur de haute affinité à l'IL-12 (IL-12Rβ1β2) des lymphocytes Th1 (Figure 21). L'IL-23, en association avec l'IL-6, va permettre le maintien du phénotype Th17 et l'activation de la kinase STAT 3 responsable de l'expression du facteur de transcription RORγt [208-210] lui-même à l'origine de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-17A et IL-17F impliquées dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles vers les sites inflammatoires [211, 212].

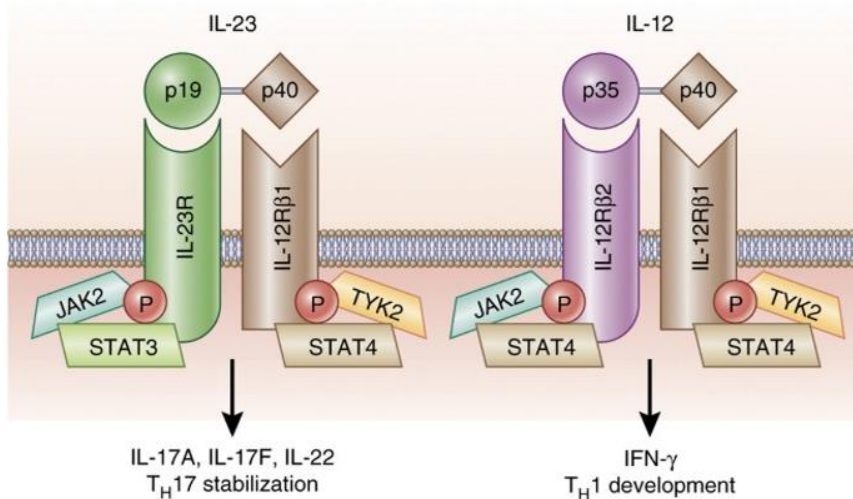


Figure 21 : Structure des récepteurs à l'IL-23 et à l'IL-12

Les cytokines IL-12 et IL-23 sont constituées d'une sous-unité commune (p40) et leurs récepteurs spécifiques partagent la chaîne IL-12Rβ1. Les différences de signalisation induites par ces cytokines dépendent donc de la deuxième chaîne, IL-23R et IL-12Rβ2, de leur récepteur. La voie de l'IL-23 va maintenir un phénotype Th17 en activant STAT3 responsable de la synthèse d'IL17A, d'IL-17F et d'IL-22. La voie IL-12 va quant à elle orienter le lymphocyte vers un phénotype Th1 en activant STAT4 responsable de la synthèse d'IFN-γ, d'après Teng et al., [213].

Lymphocytes Tfh

Les lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) participent à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps de hautes affinités d'où le grand nombre d'étude réalisées dans des contextes pathologiques tels que les infections à VIH ou les maladies auto-immunes. L'orientation vers le phénotype Tfh dépend d'un fort signal TCR comme pour les lymphocytes Th1 et d'un environnement cytokinique riche en IL-6 et en IL-21 comme pour les lymphocytes Th17. Ces différents signaux sont à l'origine de l'expression du facteur de transcription Bcl-6 [214-216] lui-même responsable de l'expression du récepteur CXCR5 pour la chimiokine CXCL13 produite par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) de la zone B des organes lymphoïdes secondaires. CXCL13 permet la migration des lymphocytes Tfh vers cette zone et leur interaction avec les lymphocytes B par la voie ICOS/ICOSL. La déficience en ICOS entraîne d'ailleurs une perte d'efficacité de la réponse anticorps dépendantes des lymphocytes T. Les lymphocytes Tfh permettent la commutation de classe par la production de cytokines telles que l'IFN-γ, l'IL-4 et l'IL-12. De plus, par la synthèse d'IL-21, ils sont impliqués dans la prolifération, la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps de hautes affinités par les hypermutations somatiques à l'origine de la maturation d'affinité [217-219].

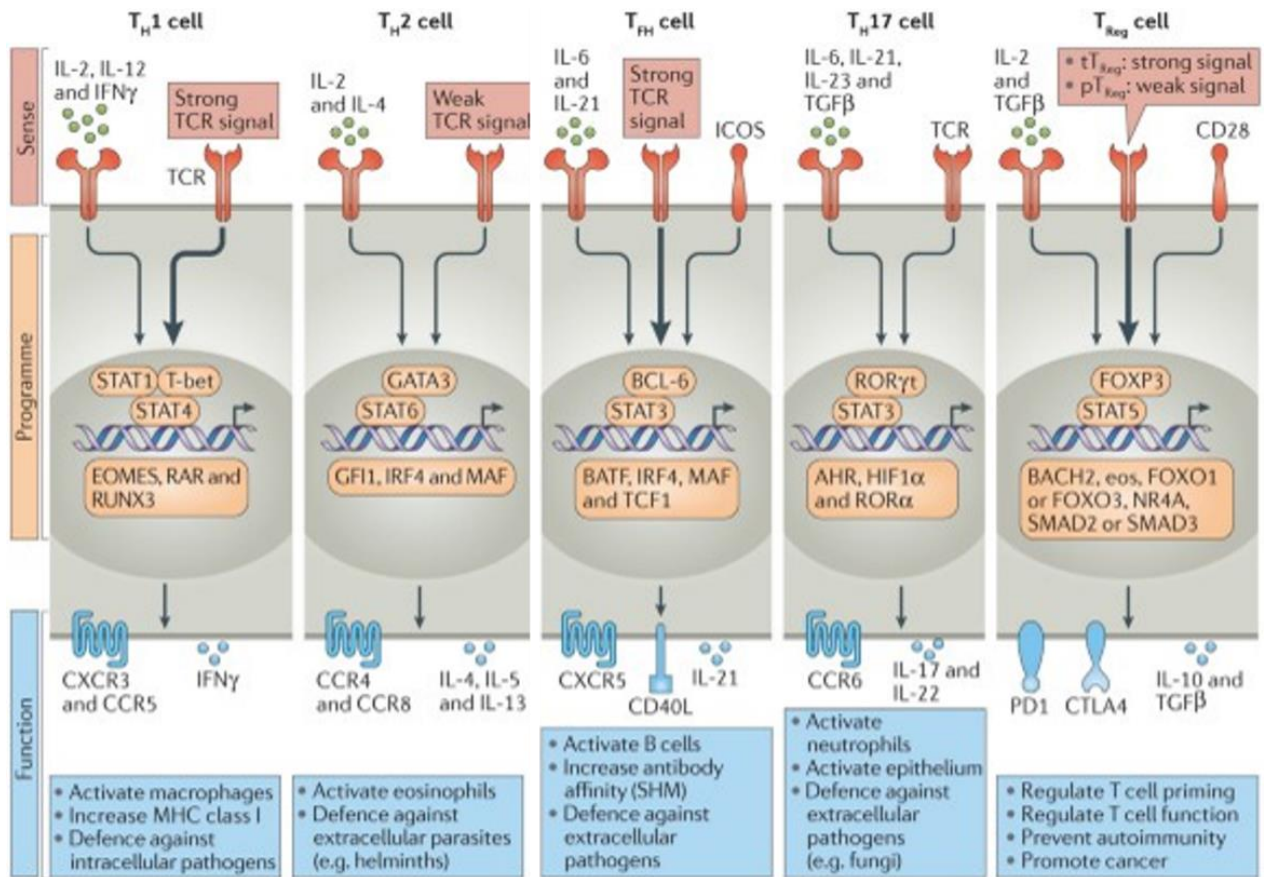


Figure 22 : Principales caractéristiques des différents sous-types de lymphocytes T helper et les signaux associés à leur orientation et leurs fonctions

Les lymphocytes Th1 nécessitent un fort signal TCR associé à la présence d'IL-12 et d'IFN- γ . Ils vont par l'activation du facteur de transcription T-bet, sécréter de l'IFN- γ et ainsi activer les macrophages. Les lymphocytes Th2 ont besoin d'un signal TCR plus faible et de la présence d'IL-4 dans leur environnement. Par l'expression de GATA3, ils vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 impliquées dans l'activation notamment des polynucléaires éosinophiles. Les lymphocytes T_{fh} sont induit par un fort signal TCR associé à un signal ICOS/ICOSL et la présence d'IL-6 et d'IL-21. Ils se caractérisent par l'expression du facteur de transcription Bcl-6 et du récepteur aux chimiokines CXCR5. L'expression de CD40L et la sécrétion d'IL-21 leur confère un rôle majeur dans la maturation d'affinité du BCR. Les lymphocytes T naïfs seront orientés vers la voie Th17 par la présence simultanée d'IL-6, de TGF- β , d'IL-21 et d'IL-23 dans leur environnement. Leur activation va entraîner l'expression de ROR γ t et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IL-22. À l'inverse, les lymphocytes T_{reg} nécessitent la présence de TGF- β associé à de l'IL-2 pour synthétiser le facteur de transcription Foxp3 lui-même impliqué dans la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β , d'après Dupage et al., [220]

ii. Rôle de P2X7 dans l'orientation phénotypique

En plus de son rôle dans la maturation des cytokines, P2X7 joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T matures naïfs et leur orientation vers certains phénotypes effecteurs en particulier Th17.

Lors de l'interaction des lymphocytes T avec les DC, la signalisation TCR/pCMH, associé à la costimulation CD28/B7 induit le relargage autocrine d'ATP par la protéine canal pannexine 1 [221]. Cette forte augmentation de la concentration en ATP dans le microenvironnement cellulaire permet un influx calcique dépendant de P2X7. La signalisation calcique intracellulaire est essentielle à l'activation du lymphocyte T puisqu'elle permet la phosphorylation activatrice des MAP kinases, notamment ERK 1 et 2 impliquées dans l'activation du facteur de transcription NFAT responsable de l'expression de l'IL-2 et donc de la prolifération des lymphocytes T [222, 223]. La molécule de homing CD62L, ou L-sélectine, est exprimée à la membrane des leucocytes. Elle fait partie de la famille des sélectines au sein de laquelle on retrouve la P- et la E-sélectine exprimées respectivement à la membrane des plaquettes et des endothéliums. La molécule CD62L est impliquée dans le retour des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires par interaction avec des ligands spécifiques exprimés par les endothéliums vasculaires au niveau de structure spécialisée appelés HEV (High Endothelium Veinules) [224-226]. De fait, les lymphocytes T effecteurs présents au sein des foyers inflammatoires riches en ATP vont cliver leur molécule CD62L suite à l'activation séquentielle de P2X7 et de la métalloprotéase ADAM 17 [83, 84, 227]. Cependant, les voies de signalisation menant à l'activation d'ADAM 17 en réponse à la stimulation de P2X7 par l'ATP restent mal comprises. Ce clivage va empêcher la recirculation des lymphocytes T vers les organes lymphoïdes secondaires et leur rétention au sein des foyers inflammatoires (Figure 19).

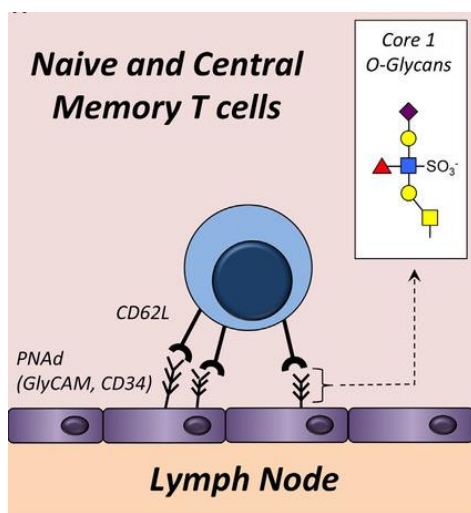


Figure 23 : Rôle de la L-sélectine CD62L dans la localisation tissulaire des lymphocytes T

La molécule de homing CD62L interagit avec les glycanes de type core 1, exprimés à la membrane des High Endothelium Veinules (HEV) des organes lymphoïdes secondaires. La présence de CD62L à la surface des lymphocytes T leur permet donc de réintégrer ces structures spécialisées, d'après Hobbs et al., [228].

P2X7 est impliqué dans l'orientation du phénotype effecteur des lymphocytes T à travers la maturation de l'IL-1 β qui joue un rôle majeur dans la réorientation des Treg vers le phénotype

inflammatoire Th17 en réduisant le taux d'expression de Foxp3. De plus, l'IL-6 présent au sein du foyer inflammatoire va augmenter la sécrétion autocrine d'ATP et induire la mort des lymphocytes Treg [229, 230]. À l'inverse, l'absence de P2X7 ou son inhibition par un antagoniste va entraîner une augmentation du taux de lymphocytes pTreg. D'ailleurs, une déficience en P2X7 dans un microenvironnement tumoral augmente la proportion de Treg entraînant une inhibition de la réponse antitumorale en particulier par une diminution du nombre de lymphocytes T CD8⁺ [231]. P2X7 semble également contrôler les fonctions des lymphocytes Tfh puisque sa déficience est corrélée à une augmentation des taux d'auto-anticorps anti-ADN et à la pathogénèse du lupus [232]. Enfin, il est important de noter que P2X7 est impliqué dans la modulation du métabolisme énergétique [233, 234]. Or celui-ci varie selon l'état de différenciation des leucocytes. Il a par exemple été montré que les macrophages anti-inflammatoires de type M2 et les lymphocytes Treg utilisent la voie du métabolisme oxydatif alors que les macrophages pro-inflammatoires de types M1 et les lymphocytes Th17 utilisent préférentiellement la voie de la glycolyse [235]. La question se pose donc de savoir quelle est l'influence de P2X7 dans le choix des voies métaboliques utilisées par les leucocytes et donc dans l'orientation vers un phénotype de différenciation et son maintien.

iii. Lymphocytes T cytotoxiques

Du fait de leur pouvoir cytotoxique, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ nécessite un contrôle encore plus strict que celle des lymphocytes T CD4⁺, en particulier, en ce qui concerne l'intensité des signaux de costimulation CD28/B7. L'expression de B7 par les DC étant transitoire, ces dernières n'auront pas systématiquement la capacité d'activer les lymphocytes T CD8⁺ du fait d'une réduction trop importante du taux d'expression en molécules B7. Cependant, une réactivation de la DC sera possible en cas d'interaction avec des lymphocytes T CD4⁺ exprimant la molécule CD40L ce qui leur permettra de retrouver un taux maximum d'expression de molécule B7 et donc d'activer des lymphocytes T CD8⁺ [236, 237]. Les lymphocytes T CD8⁺ vont alors proliférer, de façon IL-2 dépendante, puis se différencier en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) [238]. Les CTL sont impliquées dans l'élimination par apoptose des cellules infectées par des pathogènes à développement intracellulaire, comme les virus, dont les peptides antigéniques seront apprêtés et présentés à la membrane de la cellule infectée par les molécules de classe I du CMH. L'élimination des cellules infectées peut être réalisée par deux voies indépendantes, la voie Fas/Fas ligand (FasL) et la voie

perforine/granzyme. Le type de voie préférentiellement utilisée au cours d'une infection virale pour éliminer les cellules reste cependant mal compris. L'expression du gène codant pour FasL dans les lymphocytes T CD8⁺ est dépendante de la présence des facteurs de transcription activés par la signalisation TCR en particulier NFAT, NF-κB, AP-1. La protéine FasL sera alors exprimée et stockée dans des vésicules sous-membranaires. Lors de la reconnaissance du complexe pCMH des cellules infectées par le TCR des CTL, ces vésicules vont fusionner avec la membrane plasmique des CTL et permettre l'expression membranaire de FasL. Son interaction avec le récepteur d'apoptose Fas exprimé à la surface des cellules cibles entrainera leur mort par activation des caspases [239]. La voie perforine/granzyme repose sur la libération dans la synapse immunologique formé entre la CTL et sa cellule cible de molécules pro-apoptotiques. Ainsi, les perforines vont induire, à la membrane de la cellule cible, la formation d'un pore Ca²⁺ dépendant permettant l'entrée des granzymes B [240, 241]. Une fois dans le cytoplasme, la protéase granzyme B va activer différentes caspases initiatrices et effectrices soit de façon directe soit de façon indirecte par clivage de la molécule BID, elle même responsable du relargage de cytochrome c par la mitochondrie [242-244] (Figure 24). Enfin, les cellules apoptotiques seront éliminées par phagocytose suite à l'externalisation des phosphatidylsérines à la membrane plasmique [245-247].

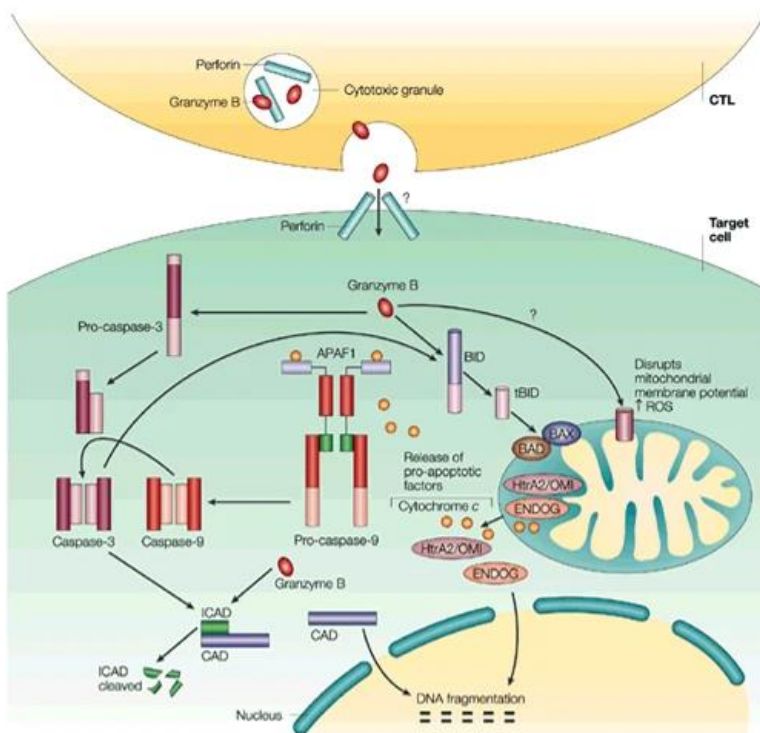


Figure 24 : Mode d'action intracellulaire de la voie cytotoxique perforine/granzyme

Lors de l'interaction entre la CTL et sa cellule cible, les perforines vont être libéré au niveau de la synapse immunologique et former un pore à la membrane de la cellule à éliminer. Ce pore va permettre l'entrée des granzymes. La mort cellulaire par apoptose va ensuite être induite par l'activation par les granzymes de la caspase 3 de façon directe ou dépendante de la voie mitochondriale d'après Liebermann et al., [248].

De plus, les CTL ont comme les lymphocytes Th de fortes capacités de sécrétion de cytokines, en particulier l'IFN- γ qui a la capacité d'augmenter l'expression des molécules de classe I du CMH et donc la présentation antigénique aux CTL.

Il existe également des lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques. Ces CTL d'abord considéré comme des artefacts de culture *in vitro* ont été ensuite retrouvés chez l'homme et la souris. Ces lymphocytes cytotoxiques non communs semblent être dépendant d'un contexte inflammatoire très important et sont donc associés à des infections virales chroniques, des réponses antitumorales ou des contextes auto-immuns. Ces CTL CD4⁺ restent soumis à une activation par les molécules de classe II du CMH mais présentent comme les CTL CD8⁺ la capacité à produire et sécréter les perforines et les granzymes. En cas d'infection par un pathogène utilisant un mécanisme d'échappement aux CTL CD8⁺ (inhibition de la synthèse de CMH I par le virus de l'herpès simplex par exemple), les CTL CD4⁺ peuvent initier la mort cellulaire par interaction avec les molécules du CMH II exprimé à la surface de cellules infectées non-CPA et présentant les antigènes intracellulaires par cross présentation. Les CTL CD4⁺ expriment CRTAM (class I restricted T cell associated molecule) ainsi que CD57 (Leu7) et perdent l'expression de la molécule CD28 de costimulation.

g) Mémoire immunitaire

La mémoire immunitaire peut être définie comme la capacité des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ à persister à long terme dans l'organisme et à répondre plus rapidement à une nouvelle stimulation par le même antigène. La mémoire immunitaire a été particulièrement étudiée dans le cadre des lymphocytes T CD8⁺ et des infections virales [249, 250]. Par rapport aux lymphocytes naïfs de même spécificité antigénique, les lymphocytes mémoires persistent en plus grand nombre, peuvent infiltrer les organes périphériques et proliférer de façon très rapide lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène ainsi que sécréter des cytokines effectrices, telles que l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ , ou exécuter des fonctions cytotoxiques [251-253]. Malgré certaines similitudes entre les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et mémoires aux niveaux moléculaire et fonctionnel, les cellules effectrices subissent une forte contraction en fin de réponse immunitaire [252, 254-257] et perdent l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127) contrairement aux cellules mémoires qui maintiennent un taux élevé de

molécules Bcl-2 ce qui leur permet d'échapper à la mort cellulaire par la voie intrinsèque d'apoptose BIM [258-262]. D'autre part, la présence d'IL-15 durant la phase de contraction du pool de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs est nécessaire pour la production et le maintien des lymphocytes T CD8⁺ mémoires comme le montre les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-15 [263-266]. Il est intéressant de noter, qu'au cours d'une réinfection, certaines réponses des lymphocytes T CD8⁺ mémoire sont moins protectrices que d'autres et dépendent de la nature de l'agent pathogène ce qui met en évidence la grande hétérogénéité des lymphocytes T CD8⁺ mémoires [267]

i. Lymphocytes T mémoires centraux

Les lymphocytes T de la mémoire centrale ou mémoires centraux (T_{CM}) sont majoritairement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils expriment CCR7, le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21, et la molécule de homing CD62L, ce qui leur permet à la fois de passer en circulation mais aussi de pouvoir réintégrer les organes lymphoïdes secondaires [268]. Ces lymphocytes sont très sensibles à l'activation par le TCR. D'autre part, les lymphocytes T_{CM} CD4⁺ expriment rapidement à leur membrane la molécule de costimulation CD40L. Les T_{CM} sont spécialisés dans la réponse aux infections systémiques du fait de leur localisation au sein des organes lymphoïdes secondaires et leur forte capacité proliférative en réponse à l'IL-2 [249] [269-271].

ii. Lymphocytes T résidents mémoires

Les lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM}), contrairement aux autres types de lymphocytes T mémoires, comprennent une grande majorité de lymphocytes non migratoires [267]. Ces lymphocytes T sont des résidents à long terme de la plupart des épithéliums. Ils expriment fortement les récepteurs de chimiokines CCR9 et CXCR3 permettant leur migration vers les tissus tels que le derme ou la lamina propria de l'intestin [272, 273]. Le maintien des T_{RM} dans ces tissus est lié à l'expression constitutive de CD69 entraînant la perte d'expression membranaire du récepteur S1P₁ et donc de leur capacité de recirculation [274]. La production de TGF-β par les cellules épithéliales joue également un rôle dans la séquestration des T_{RM} dans ces tissus en augmentant leur expression membranaire des intégrines αE:β7 impliquées dans l'interaction avec la E-cadhérine des cellules épithéliales [273, 275, 276]. Les T_{RM} présentent une forte capacité de reconnaissance des antigènes et de production d'IFN-γ et de chimiokines.

Ils vont ainsi permettre le recrutement et les fonctions effectrices des cellules du système immunitaire innée et adaptatif au sein des tissus inflammés [277-279].

iii. *Lymphocytes T effecteurs mémoires*

Les lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}) perdent l'expression de CCR7 et de CD62L ce qui empêche leur retour au sein des organes lymphoïdes secondaires [268, 280]. À l'inverse, ils expriment plus fortement les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ et sont donc spécialisés dans l'adressage et l'infiltration des tissus inflammés. Ils présentent également une capacité cytotoxique plus importante que les T_{CM} [281]. Ces lymphocytes sont capables d'une différenciation rapide en lymphocytes T effecteurs. Ils expriment également des cytokines pro-inflammatoires ainsi que de l'IFN- γ impliquées dans la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en effecteurs de type Th1 [282, 283].

Tableau 1 : Phénotype et caractéristiques des différents sous-types de lymphocytes T mémoires, adapté de [284]

Subset	Phenotype	Function	Location/Trafficking	Transcription factors
T_{em}	CCR7 ^{lo} /CD62L ^{lo} Cx3Cr1 ^{hi} /CD27 ^{lo} CD127 ^{hi} CD27 ⁻ /CD45RA ⁻ (humans)	++ Cytotoxicity +- Prolifération	Circulation	Tbet ^{hi} Blimp1 ^{hi} /ID2 ^{hi} /STAT4 ^{hi}
T_{cm}	CCR7 ^{hi} /CD62L ^{hi} Cx3Cr1 ^{lo} /CD27 ^{hi} CD127 ^{hi} CD27 ⁺ /CD45RA ⁻ (humans)	+– Cytotoxicity ++ Prolifération	Circulation Lymph nodes	Tbet ^{lo} Eomes ^{hi} /TCF1 ^{hi} /Bcl6 ^{hi} / STAT3 ^{hi} /ID3 ^{hi}
T_{rm}	CD69 ^{hi} /CD103 ^{hi} /CD49a ^{hi} (depending on tissue) CXCR3 ^{hi} /KLRG1 ^{lo} /CCR7 ^{lo} / CD62L ^{lo} , CD127 ^{hi} Cx3Cr1 ^{lo/int}	Sensing and alarm + prolifération	Tissue resident	KLF2 ^{-/lo} /Eomes ^{-/lo} Tbet ^{lo} /TCF1 ^{lo} Hobit ^{hi} /Blimp1 ^{hi}

h) Régulation de la réponse immunitaire et maintien de la tolérance périphérique

i. *Lymphocytes T régulateurs*

La réponse immunitaire est un processus finement régulé aussi bien en ce qui concerne son initiation que l'amplitude et l'arrêt des réponses. Ainsi, des lymphocytes T dits régulateurs (Treg) ont pour rôle d'inhiber et de contrôler les réponses lymphocytaires T normales et de maintenir la tolérance périphérique au soi. Dans la population de lymphocytes T $CD4^+$, 2 types de lymphocytes T régulateurs nommés thymiques (tTreg) et périphériques (pTreg) ont été décrits [65, 285]. Les tTreg sont produits au sein du thymus lors de la sélection négative et

dérivent des lymphocytes T CD4⁺ sélectionnés sur l'avidité du TCRαβ pour les molécules du soi (voir paragraphe 1.a.iv.). À l'inverse, les pTreg dérivent de lymphocytes T CD4⁺ naïfs et sont produits en périphérie par la présence d'un environnement riche en IL-2 ainsi qu'en cytokines anti-inflammatoires TGF-β1, IL-10 et IL-35 responsables de l'expression de Foxp3. La déficience en IL-2 et en TGF-β entraîne d'ailleurs une perte totale des Treg chez la souris [286-289] [65, 290-295]. Les Treg expriment un fort taux de CD25, CD62L et CTLA-4 et du facteur de transcription Foxp3 qui interfère avec l'activité productrice d'IL-2 de NFAT et AP-1. Les molécules CTLA-4 des Treg interfère avec la capacité des molécules B7 des DC à activer les lymphocyte T conventionnels. De plus, la forte expression de CD25 à la membrane des Treg diminue la quantité d'IL-2 disponible pour la prolifération des lymphocytes T conventionnels [285, 296]. Les Treg peuvent également moduler la réponse lymphocytaire T par la sécrétion de TGF-β et d'IL-10 responsable respectivement de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et de la réduction de l'expression des molécules du CMH et de costimulation des DC limitant ainsi la production d'IL-12 et d'IL-23 impliquées dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th1 ou Th17 (Figure 25) [297-301]. Enfin, les Treg expriment fortement les ecto-ATPases CD39 et CD73, impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en adénosine, une molécule aux propriétés immunomodulatrices [302]. Une déficience en Treg entraîne de nombreux syndromes auto-immuns et une sensibilité accrue à l'allergie. À l'inverse, une activité Treg excessive limite la capacité du système immunitaire à contrôler le développement d'un cancer et de maladies infectieuses [303, 304].

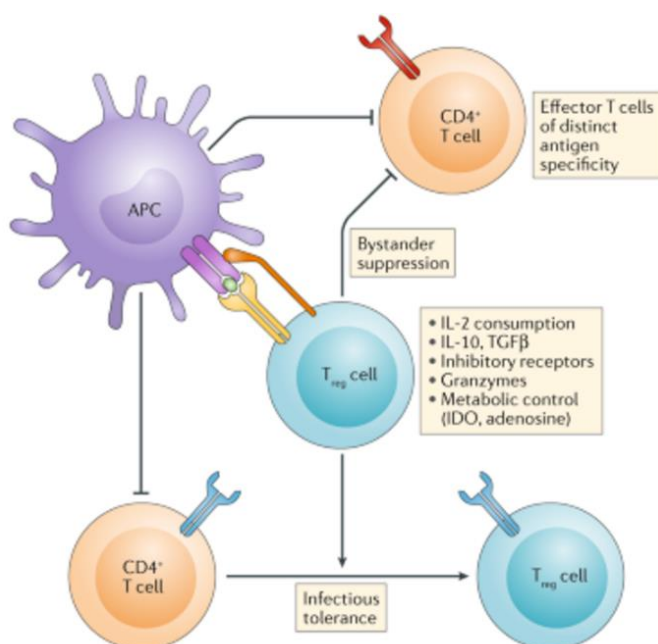


Figure 25 : Mécanismes de régulation de la réponse immunitaire par le Treg

Le lymphocyte Treg va contrôler la réponse immunitaire après interaction de son TCR avec un antigène spécifique. Il va induire la diminution d'expression de la molécule B7 de costimulation à la membrane des DC et réduire l'activation des lymphocytes T effecteurs par la sécrétion des cytokines telles que l'IL-10 et le TGF-β et la capture de l'IL-2 présent dans l'environnement inflammatoire afin de réduire la prolifération des lymphocytes Th et CD8⁺, d'après Raffin et al., [285]

ii. Régulation de la réponse immunitaire par les ectonucléotidases CD39 et CD73

L'ATP extracellulaire potentialise les réponses inflammatoires ainsi que l'activation et la différenciation lymphocytaire à travers la stimulation de 2 familles de récepteurs purinergiques P2X et P2Y. C'est une molécule de signalisation dont la libération dans le microenvironnement lymphocytaire et sa dégradation par des ectonucléotidases est essentielle pour la régulation de la réponse immunitaire. La libération d'ATP extracellulaire est considérablement amplifiée par des mécanorécepteurs ou après stimulation du lymphocyte T par la voie TCR à l'origine d'un efflux autocrine d'ATP par les protéines canal pannexines 1 ou bien dans le contexte de la nécrose responsable de la libération du contenu intracellulaire [231, 305-307]. La dégradation de l'ATP se fera par hydrolyse successive des groupements phosphates associés aux molécules d'adénosines. L'ATPase CD39 va ainsi permettre la dégradation de l'ATP en ADP et AMP. Cette activité est d'ailleurs réversible par l'action de l'adénylate kinase. L'AMP peut ensuite être hydrolysée en adénosine par la nucléotidase CD73 (Figure 26).

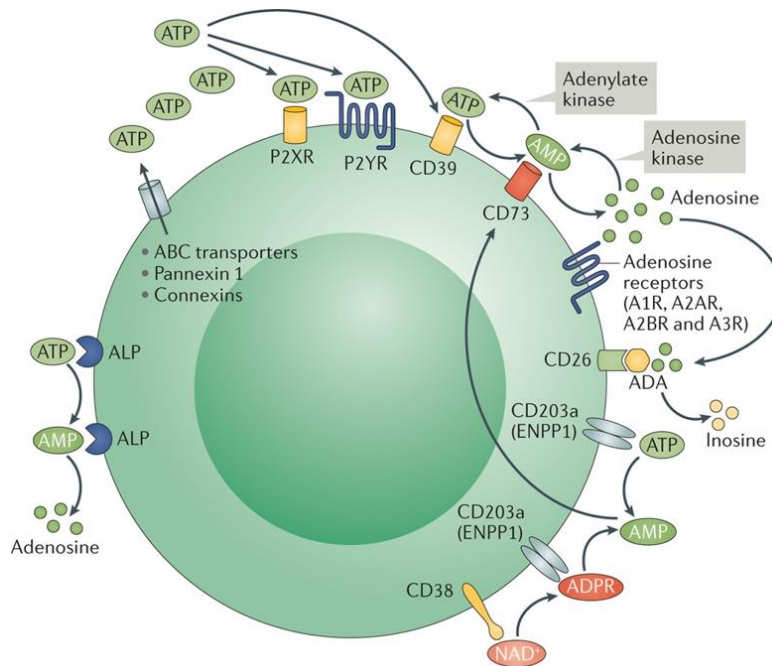


Figure 26 : Voie d'hydrolyses de l'ATP extracellulaire menant à la production d'adénosine

L'ATP extracellulaire peut directement activer les récepteurs purinergiques P2X ou P2Y ou être hydrolysé en adénosine-monophosphate (AMP) puis en adénosine responsable d'une signalisation immunosuppressive via les récepteurs A1, A2 et A3R, d'après Vijayan et al., [308]

Il existe plusieurs types de récepteurs à l'adénosine (A1, A2A, A2B et A3) dont l'affinité pour leur ligand varie de concentration nano (250-700 nM) à micro molaire (25 µM) pour les moins

sensibles comme A2BR. Ces récepteurs sont également différenciés par leur signalisation intracellulaire. En effet, alors que les A2R (A et B) potentialisent l'activité AMPc favorisant une activité immunosuppressive, les A1R et A3R l'inhibent [309, 310]. Ainsi, la présence d'adénosine dans le microenvironnement membranaire du lymphocyte T CD4⁺ va l'orienter vers un phénotype pTreg par activation des voies de production du facteur de transcription Foxp3 [311]. De façon intéressante, il induit également la production de la protéine de membrane LAG3 impliquée dans la régulation négative de la prolifération et des fonctions des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. La production d'IL-2 va également être réduite et donc la prolifération clonale inhibée. Le Treg exprime fortement CD39 et CD73 permettant le maintien et même l'augmentation des taux d'adénosines et donc de la signalisation A2AR. Cette voie va d'ailleurs permettre l'expression de la molécule CTLA-4 par le Treg inhibant par compétition, l'activation des lymphocytes T conventionnels par la voie CD28/B7. La présence des ectonucléotidases CD39 et CD73 à la membrane des lymphocytes T CD8⁺, et donc la production d'adénosine, conduit à l'inhibition de la production d'IL-2 et d'IFN-γ et à l'augmentation membranaire du taux de molécules inhibitrices PD-1 [312]. Cette signalisation par l'adénosine va donc inhiber indirectement l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs (Figure 27) [313]. L'élimination finale de l'adénosine se fera par l'activité de l'adénosine déaminase (ADA) CD26 (Figure 26). Ainsi, un défaut en déaminase CD26 pourra être responsable d'un effet immunosuppresseur maintenu et de l'apparition d'un syndrome SCID du fait de l'accumulation d'adénosine dans le microenvironnement membranaire du lymphocyte T [314].

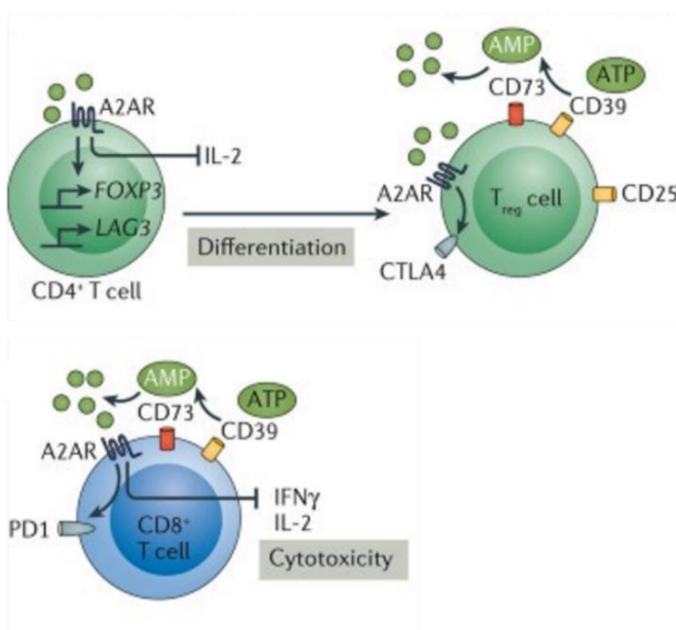


Figure 27 : Effet de l'Adénosine sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

La fixation d'adénosine à son récepteur A2AR exprimé à la membrane des lymphocytes T CD4⁺ va l'orienter vers un phénotype Treg Foxp3⁺. Dans le lymphocyte T CD8⁺, la voie adénosine A2AR va inhiber la production d'IFN-γ et d'IL-2 et ainsi réduire l'activité cytotoxique, d'après Vijayan et al., [308].

iii. Défaut de régulation et perte de tolérance périphérique

La régulation de la réponse immunitaire est un processus essentiel dans le maintien de la tolérance périphérique et de nombreuses voies sont impliquées dans cette régulation. Ainsi, des altérations au sein des voies Foxp3, CTLA-4 ou LAG3 peuvent mener au développement de pathologies auto-immunes.

Une déficience en lymphocytes Treg suite à la mutation récessive *scurfy* du gène *Foxp3* porté par le chromosome X entraîne l'apparition d'un fort phénotype auto-immun nommé syndrome IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, liée à l'X) qui se caractérise par l'apparition de lésions cutanées, une inflammation des glandes lacrymales, une adénopathie et une splénomégalie massive entraînant la mort accélérée des souris *scurfy* en environ 3 semaines [303, 304]. Des mutations dans le gène codant pour CTLA-4 responsables d'une perte d'expression de la molécule de co inhibition CTLA-4 sont aussi impliquées dans la survenue de syndromes auto-immuns caractérisés par une lymphoaccumulation massive ainsi que l'apparition d'atteintes tissulaires due à une infiltration lymphocytaire similaire à ce qui est observés chez les souris déficientes en Treg. Enfin, CTLA-4 qui présente un profil inhabituel d'expression peut être affecté par un défaut de recyclage. En effet, cette protéine est majoritairement présente dans le compartiment intracellulaire, au sein de vésicules, et soumise à un trafic rapide entre la membrane plasmique et les endosomes de recyclage. Une déficience dans les protéines impliquées dans ce trafic, notamment les protéines de la famille Rab, sont responsable d'auto-immunité sévère [315, 316]. De façon intéressante, LAG3 peut être impliquée dans le développement de pathologies auto-immunes suite à son inhibition ou sa potentialisation. LAG3 est en effet essentiel au maintien de la tolérance dans un contexte génétique favorisant l'auto-immunité. Ainsi, les souris NOD (non-obese diabetic) présentent ainsi une accélération de leur pathologie après la délétion totale de LAG3. À l'inverse, la perte de LAG3 dans les Treg conduit à une amélioration de la pathologie due à l'augmentation de la prolifération et la fonctionnalité des Treg [317, 318].

i) Homéostasie des lymphocytes T

La réponse immunitaire adaptative se caractérise par la prolifération massive des lymphocytes T dont le TCR est spécifique de l'antigène. La phase d'expansion clonale permet ainsi la création d'un pool de lymphocytes T spécifiques du même antigène (voir paragraphe I.b.iii.). En fin de réponse immunitaire, ce pool de lymphocytes T est réduit par 2 mécanismes distincts de mort cellulaire programmée dépendant en réponse primaire (première rencontre avec l'antigène) de la voie mitochondriales BIM et en réponse secondaire (réactivation des lymphocytes T spécifique de l'antigène) de la voie des récepteurs de mort Fas/FasL (Figure 28)[319].

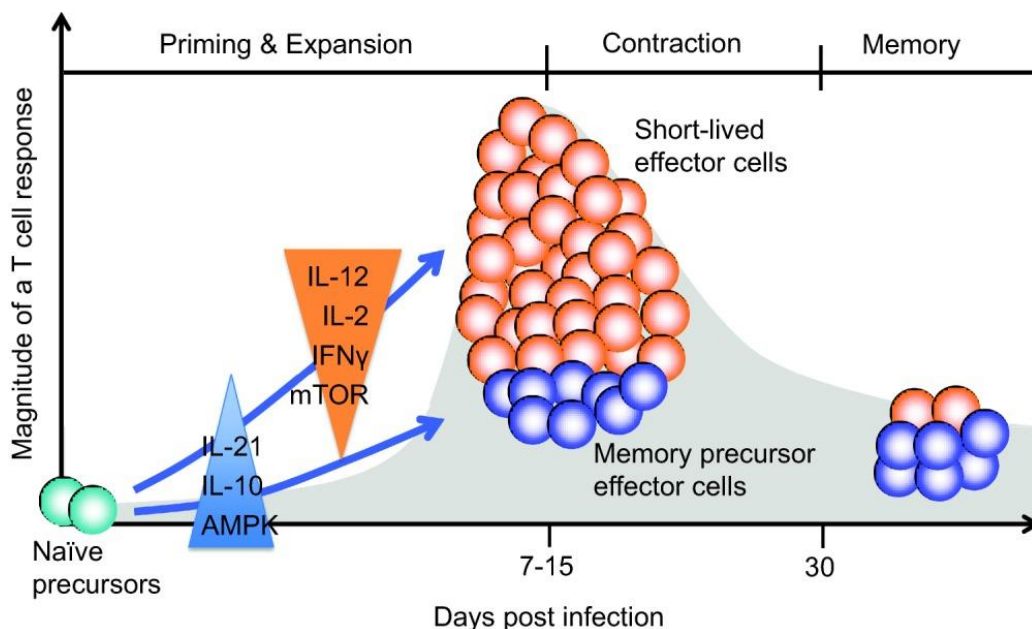


Figure 28 : Homéostasie des lymphocytes T en réponse à une infection

La rencontre du lymphocyte T naïf avec une DC présentant un antigène dont il est spécifique va entraîner son activation. La présence d'IL-2, IL-12 et IFN- γ va induire l'expansion clonale et la mise en place d'un pool important de lymphocytes T effecteurs. Cette phase d'expansion génère des lymphocytes effecteurs à durée de vie limitée et des lymphocytes effecteurs dits « précurseurs mémoires » dont la durée de vie est plus longue. Après la résolution de l'infection, le pool de lymphocytes effecteurs doit être régulé négativement, c'est la phase de contraction clonale. Au cours de cette phase, la majeure partie des effecteurs générés dans la phase d'expansion va entrer en apoptose. Une petite proportion de ces effecteurs, les précurseurs mémoires, va cependant être conservée sous la forme de lymphocytes T mémoires.

i. Initiation de l'apoptose par la voie intrinsèque BIM

La mort par la voie mitochondriale BIM résulte de la carence des lymphocytes T en leur facteur de croissance, la cytokine IL-2. La fixation de l'IL-2 sur son récepteur induit l'activation de la

kinase JNK (c-jun kinase) responsable par phosphorylation de l'inactivation de la caspase 9 et de la protéine pro-apoptotiques Bad ainsi que de l'activation de la kinase IKK responsable de la dégradation du facteur IKB (inhibitor of NF- κ B) à l'origine de l'inactivation du facteur de transcription NF- κ B responsable de la transcription des gènes de survie Bcl-xL, Bcl2 et cFlip. À l'inverse, la carence en IL-2 va entraîner une inhibition de la kinase IKK et l'activation de la protéine pro-apoptotique BIM de la famille Bcl-2. La carence en IL-2 associée à la perte d'expression des récepteurs à l'IL-7 (CD127) et à l'IL-2 (CD25) va également diminuer l'expression de la protéine anti apoptotique Bcl-2 en réduisant l'activation de STAT5. La diminution en Bcl-2 et l'activation de BIM va entraîner une libération, dépendante des protéines Bax et Bak, de cytochrome c par la mitochondrie. En se fixant sur la molécule APAF-1, le cytochrome c va permettre la formation de l'apoptosome responsable du clivage de la pro-caspase 9 en caspase 9 active qui va initier, en clivant les caspase effectrices 3, 6 et 7, la mort cellulaire par apoptose (Figure 29)[320-323].

ii. Initiation de l'apoptose par la voie extrinsèque Fas/FasL

L'activation des lymphocytes T conduit à l'augmentation du taux d'expression en récepteurs d'apoptose Fas et à l'expression membranaire de son ligand FasL. La voie Fas/FasL (AICD, Activation Induced Cell Death) est dépendante de l'interaction entre Fas et FasL portés par les lymphocytes T d'où son nom de mort « fratricide ». La fixation de FasL sur son récepteur trimérique Fas entraîne un changement de conformation permettant la formation du complexe DISC (death inducing signalling complex) composé du death domain de Fas associé à l'adaptateur FADD (fas adaptator death domain) lui-même associé à la pro-caspase 8 initiatrice (et 10 chez l'Homme) par son death effecteur domain (DED). La formation du complexe DISC permet l'auto-clivage de la pro-caspase 8 en caspase 8 active elle-même responsable du clivage activateur des caspases effectrices 3, 6 et 7 [324-327].

iii. Phase effectrice de la mort cellulaire par apoptose

Les caspases effectrices 3, 6 et 7, communes aux deux voies d'apoptose, vont induire le clivage protéolytique d'une centaine de protéines cytoplasmiques et nucléaires impliqués dans la formation de l'enveloppe nucléaire (lamines), l'expression de gènes, le métabolisme cellulaire, la réparation de l'ADN, la transduction du signal, la régulation du cycle ou le contrôle de l'apoptose. Elles activent également la DNase CAD (Caspase Activated Deoxyribonuclease) par

dégradation de son inhibiteur ICAD (Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease) (Figure 29) [328-330].

Contrairement à ce qui est observé dans les lymphocytes T, cellules dites de types 1, la caspase 8 initiatrice ne permet pas une activation efficace des caspases effectrices 3, 6 et 7 dans les cellules de types 2 (hépatocytes par exemple). Une boucle d'amplification à travers le clivage activateur de la molécule pro-apoptotique Bid par la caspase 8 est nécessaire pour la mise en place de la mort cellulaire par apoptose. Elle passe par l'activation de BIM et donc la formation de l'apoptosome à l'origine de l'activation de la pro-caspase 9 initiatrice (Figure 29).

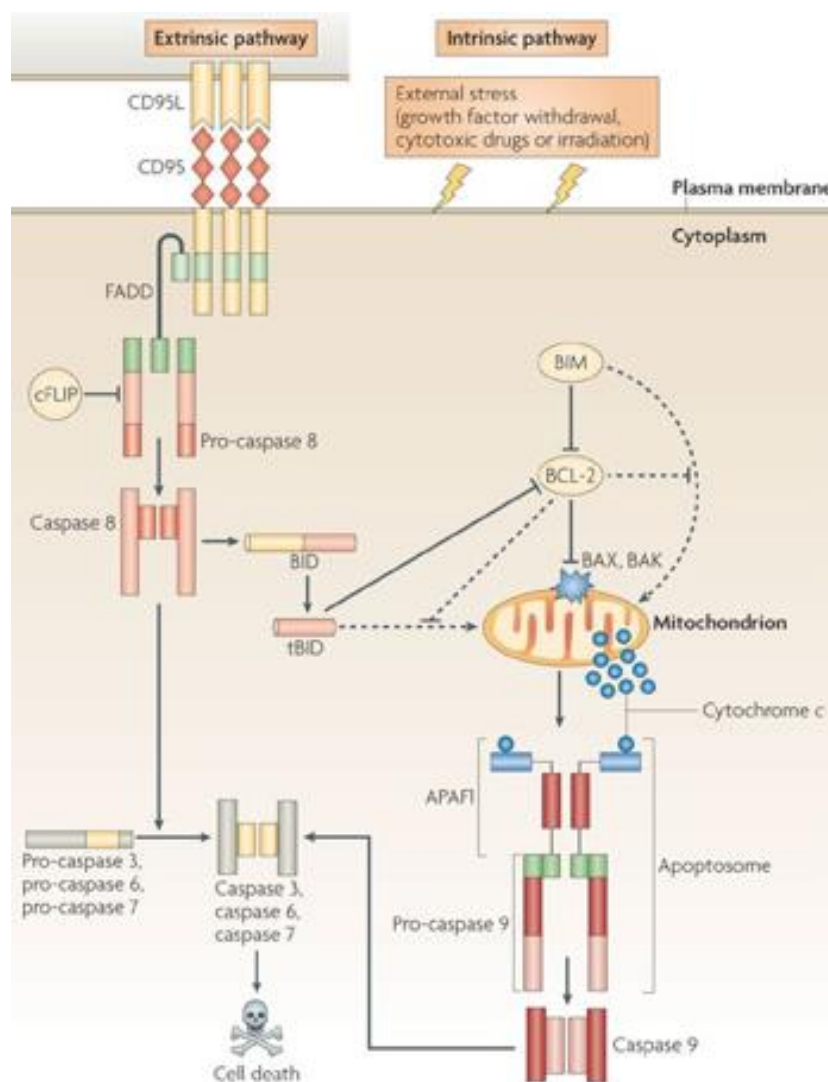


Figure 29 : Signalisation intracellulaires des voies d'apoptose BIM et Fas/FasL

La voie extrinsèque Fas/FasL va induire la formation du DISC à l'origine de l'activation de la caspase 8 initiatrice puis des caspases effectrices 3, 6 et 7 et de la mort cellulaire. La voie intrinsèque BIM est quant à elle dépendante de la voie mitochondriale et du relargage du cytochrome c par la mitochondrie, entraînant la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 initiatrice d'après Bouillet et al., [319].

iv. Élimination des cellules apoptotiques par phagocytose

À la suite de la phase effectrice d'apoptose, la phagocytose des corps apoptotiques est nécessaire à leur élimination « silencieuse » c'est à dire sans relargage du contenu cytoplasmique contrairement à la mort cellulaire par nécrose. En effet, lors de la phagocytose des corps apoptotiques le macrophage présente un phénotype anti-inflammatoire caractérisé par une augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires dont le TGF- β 1 et l'IL-10 et une diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-8 (ou son homologue murin) (Figure 30) [331]. La dégradation de l'ADN génomique par 2 étapes successives est nécessaire au maintien de cet état anti-inflammatoire. La première étape à lieu au sein de la cellule apoptotique et est dépendante d'un clivage internucléosomique par la DNase I. La deuxième étape de dégradation de l'ADN a lieu au sein du macrophage et est dépendante de la DNase II du phagolysosome. Un défaut de phagocytose peut donc être responsable d'une inflammation chronique et de la perte de la tolérance périphérique aux antigènes du soi [328, 329]. Les cellules apoptotiques, via l'expression et la sécrétion de molécules membranaires ou solubles, envoient aux macrophages différents signaux d'induction ou d'inhibition de leur phagocytose. Ainsi, le signal « find me » est dépendant de la libération de molécules chimio-attractantes telles que la protéine ribosomale S19, les nucléotides ATP et UTP ou les lipides S1P et la lysophosphatidylcholine. L'externalisation des phosphatidylsérines par les corps apoptotiques est associée au signal « eat me » et permet leur reconnaissance par les macrophages exprimant le récepteur aux phosphatidylsérines et ainsi leur phagocytose. Enfin, il existe des signaux inhibant la phagocytose dits « keep out / don't eat me » dépendant de l'interaction entre le récepteur SIRP- α des macrophages et son ligand CD47 exprimés à la membrane des cellules cibles. Ces 3 signaux permettent ainsi la régulation de la phagocytose [245, 247, 332].

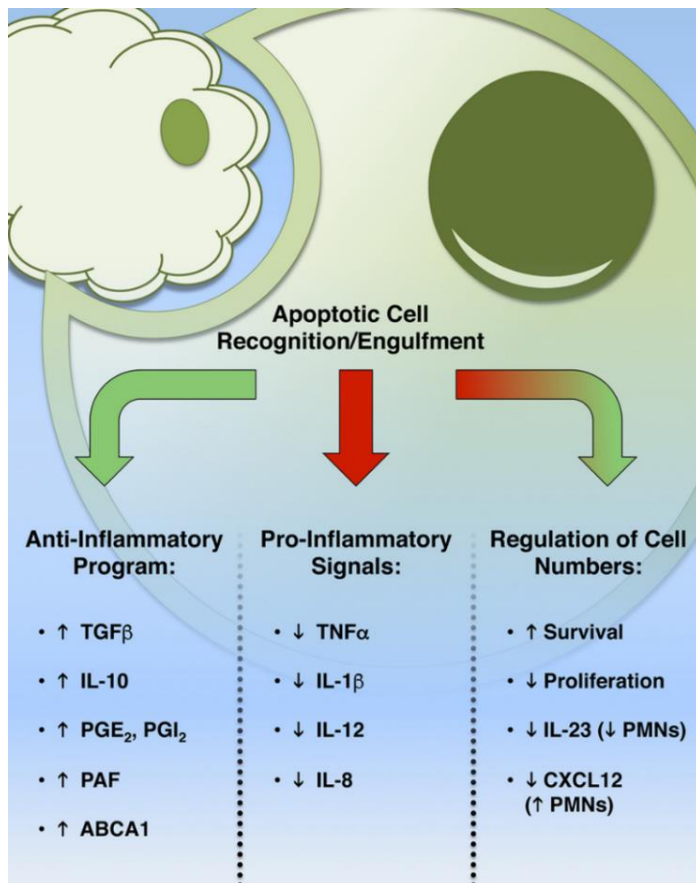


Figure 30 : Effet anti-inflammatoire de la phagocytose des cellules apoptotiques

La phagocytose des corps apoptotiques, associée aux deux phases de dégradation de l'ADN des cellules apoptotiques permet le maintien d'un état de tolérance en périphérie. Le macrophage phagocytant les corps apoptotiques augmente la production et la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β1 et réduit la production de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-12 et l'IL-8, d'après Fond et al., [332]

v. Rupture d'homéostasie et perte de tolérance périphérique

Des déficiences dans les voies de reconnaissance et de phagocytose des corps apoptotiques conduisent à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, une rupture de tolérance périphérique et le développement d'un syndrome lupique (Figure 30). Par exemple, des mutations dans les protéines TIM 1, 3 et 4 à l'origine d'une perte de reconnaissance des phosphatidylsérines par les macrophages entraînent l'apparition d'auto-anticorps anti-ADN double brin caractéristiques du lupus. De même, une altération de la dégradation de l'ADN par la DNase CAD des cellules apoptotiques et la DNase II dans le phagolysosome entraîne l'activation du macrophage et la production de cytokines pro inflammatoires et une rupture de la tolérance périphérique au soi [333, 334]. De plus, une rupture d'homéostasie des lymphocytes T peut mener à la formation de lymphocytes T auto-immuns. En effet, le pool de lymphocytes T généré lors de l'expansion clonale doit subir une étape de réduction par les voies d'apoptose BIM en réponse primaire et Fas/FasL en réponse secondaire. Des déficiences dans ces voies d'apoptose entraîne une accumulation de lymphocytes T qui ayant échappé à la mort cellulaire acquièrent un phénotype auto-immun. La première mise en évidence du lien existant

entre la perte d'homéostasie des lymphocytes T effecteurs et le développement d'un syndrome auto-immun de type lupique a été obtenu grâce à l'apparition d'une mutation spontanée dans le gène codant pour le récepteur Fas chez la souris MRL/*lpr* et les patients atteints du syndrome ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome). La mutation *lpr* responsable d'une perte de 95% de l'expression membranaire du récepteur Fas est responsable de l'apparition d'adénopathies et de splénomégalie associées, dans le fond génétique MRL, à une dérégulation massive du réseau cytokinique, des taux très élevés d'auto-anticorps anti-ADN double brin ainsi que des lésions cutanées, vasculaires et rénales responsables de la mort prématurée de ces souris vers l'âge de 4 mois. La mutation *gld* du gène codant pour le ligand de Fas (*fasL*) chez les souris C3H entraîne également ce phénotype auto-immun mettant en évidence l'importance de la voie d'apoptose Fas/FasL dans l'induction de l'auto-immunité [335-339]. Les lymphocytes T pathologiques responsables de la lymphoaccumulation des souris MRL/*lpr* présentent un phénotype particulier caractérisé par la perte d'expression des molécules de co-reconnaissance, CD4 ou CD8 et l'expression constitutive de l'isoforme RABC (B220) de la tyrosine phosphatase de membrane CD45. En conditions physiologiques cette molécule, un marqueur panB chez la souris, est exprimée à la membrane des lymphocyte T de façon transitoire au stade pré-apoptotique [340]. Il est cependant intéressant de noter que la fonction exacte de B220 dans les voies d'apoptose reste mal définie.

Comme chez l'Homme, les pathologies auto-immunes développées par les souris modèles sont complexes et multifactorielles avec une forte influence du fond génétique. Ainsi, la mutation *lpr* du gène *fas*, transposée chez des souris de fond génétique C57BL/6 ne suffit pas à induire une pathologie auto-immune de même ampleur que celle observée dans le fond génétique MRL indiquant l'implication d'autres cofacteurs. Le facteur de transcription Bcl-3, un membre atypique de la famille IκB connu pour moduler l'activité de NF-κB, a été identifié comme amplifiant significativement la dérégulation de l'homéostasie du lymphocyte T associé à la mutation *lpr* des souris B6/*lpr*. Ainsi, la souris B6/*lpr* Bcl-3KO présente une splénomégalie massive, une forte infiltration pulmonaire, hépatique et rénale de lymphocytes T et une augmentation des taux de TNF-α. La lymphoaccumulation observée chez ces souris double-mutantes est due, comme chez les souris MRL/*lpr*, à la présence de lymphocytes T B220⁺CD4⁻CD8⁻. Cependant, la lignée B6/*lpr* Bcl-3KO ne présente pas les autoanticorps anti-nucléaires spécifiques du LED [341]. De même, l'inactivation des voies de signalisation canonique (c-rel)

et non canonique (NF- κ B) de NF- κ B chez des souris B6/*gld* déficientes pour FasL entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes T pathologiques B220⁺CD4⁻CD8⁻ et, de façon inattendue, une réduction des taux d'autoanticorps anti-nucléaires [342]. Une autre étude a montré qu'une déficience en récepteur à l'IL-17A entraîne une augmentation de la lymphoaccumulation des lymphocytes T B220⁺CD4⁻CD8⁻ mais sans aggravation du phénotype lupique de la souris B6/*lpr*-IL-17RAKO comparée à la lignée parentale B6/*lpr* [343].

Ces différentes études montrent que la mutation *lpr* du gène *fas*, même associée à d'autres altérations génétiques amplifiant la lymphoaccumulation, n'est pas suffisante pour induire, dans tous les fonds génétiques, un phénotype auto-immun de l'ampleur de celui observé chez les souris MRL/*lpr*. À l'inverse, nous avons récemment montré (Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, Front. Immunol., 2022), grâce à des souris B6/*lpr* rendue déficientes pour le récepteur P2X7, qu'il existe une synergie entre ces deux récepteurs dans les voies d'homéostasie des lymphocytes T. En effet, ces souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent à la fois la lymphoaccumulation caractéristique des souris modèles MRL/*lpr* et des patients ALPS mais aussi les caractéristiques biologiques et cliniques d'un lupus systémique sévère avec notamment des autoanticorps anti-ADN double brin, une dérégulation massive de la balance cytokinique, des infiltrations hépatiques et des lésions rénales menant à une réduction significative de la durée de vie de ces souris (Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, Front. Immunol., 2022).

2. Structure et fonction des récepteurs purinergiques P2X7

a) Signalisation purinergique

L'adénosine triphosphate (ATP), molécule clef de l'énergétique cellulaire, possède un rôle important de signalisation extracellulaire. Ce concept de signalisation purinergique a pour la première fois été proposé dans les années 70 suite à la mise en évidence de l'effet neurotransmetteur de l'ATP [344]. Si ce concept a d'abord été largement débattu, il est maintenant complètement accepté. Plusieurs études ont d'ailleurs permis au fil du temps de confirmer le rôle de signalisation de l'ATP et des purines extracellulaires, dans d'autres types

cellulaires telles que les cellules endothéliales, les muscles squelettiques et les cellules du système immunitaire innée et adaptatif. L'observation d'une signalisation dépendante des purines et de l'ATP extracellulaire a entraîné la découverte des récepteurs purinergiques associés à ces signaux. Dans un premier temps, deux familles de récepteurs purinergiques ont été identifiées, les récepteurs P1 et P2 spécifiques respectivement de l'adénosine et de l'ATP ou ADP. Au cours des années, l'étude des voies de signalisations purinergiques ont permis de définir encore plus précisément les différents récepteurs associés à cette voie avec notamment la différenciation des récepteurs P2 en deux sous catégories, P2Y et P2X. Les récepteurs P2Y, pour lesquels 8 isoformes ont été identifiés chez l'Homme, font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Figure 31) et sont exprimés à la membrane de nombreux types cellulaires différents, en particulier, les plaquettes et différents types de cellules du système nerveux central [345, 346].

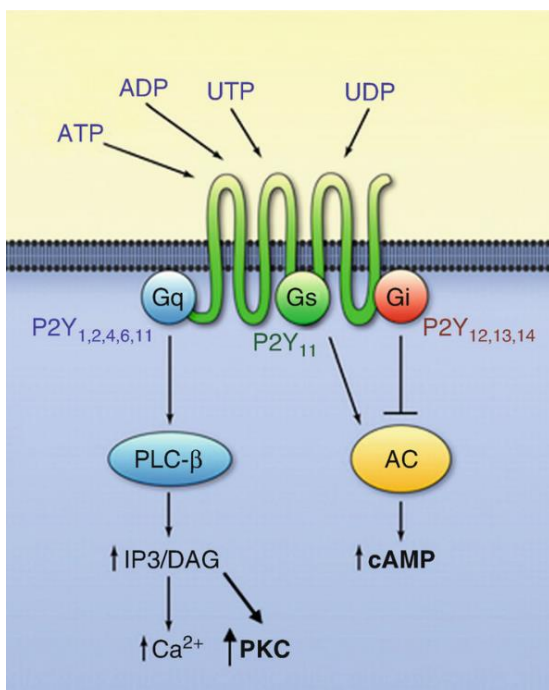


Figure 31 : Structure et signalisation par les différents types de P2Y

Les récepteurs P2Y présentent, comme tous les RCPG, 7 domaines transmembranaires et sont couplés à une protéine G. Le type de protéine G associée varie en fonction du sous-type de P2Y et influence la voie de signalisation intracellulaire mise en place après activation du récepteur par son ligand, ATP, ADP, UTP ou UDP. Les P2Y 1, 2, 4 et 6 passent par la voie de la PLC-β, via l'activation de la protéine Gq, alors que les P2Y 12, 13 et 14 inhibent l'activité acétylcholine intracellulaire par l'action de la protéine Gi. Le P2Y est le seul à potentialiser les deux voies, par l'activation des protéines Gq et Gs, d'après Rajagopal et al., 2018.

À l'inverse, les récepteurs P2X sont des récepteurs canaux dont le mécanisme de transduction est dépendant de flux ioniques induits par l'ATP extracellulaire. Les 7 sous-types connus de récepteurs P2X présentent une partie N-terminale intracellulaire, 2 domaines transmembranaires (TM1 et TM2), une large boucle extracellulaire portant les sites de reconnaissance du ligand et une queue C-terminale de longueur très variable d'un sous-type à l'autre et portant de nombreux sites d'interaction protéiques. Tous les récepteurs P2X sont

exprimés à la membrane sous forme d'homotrimères, à l'exception de P2X6 qui n'est fonctionnel que sous forme d'hétéro-multimère en association avec P2X2 ou P2X4. La cristallographie du P2X4 de poisson zèbre [347] (Figure 32) et dans un second temps celle du P2X7 de panda [348] ont permis de confirmer l'expression de ces récepteurs à la membrane sous forme de trimères et de préciser les sites de fixation au ligand ainsi que les modifications conformationnelles en réponse à une stimulation par l'ATP extracellulaire. Ces études cristallographiques ont défini chaque monomère de P2X comme une structure en « dauphin ». Le « corps » de ce dauphin est constitué de feuillettes β responsables de la rigidité et la structure globale du monomère. Il constitue la partie la plus conservée des P2X. À l'inverse, la « queue » est composée d'hélices α et représente les deux segments transmembranaires TM1 et TM2. L'association entre les 3 monomères se fait par l'interaction de la « tête » et de la « nageoire gauche » d'un monomère avec la « nageoire dorsale » du monomère adjacent. Ces trois segments sont composés d'hélices α qui leur confèrent une structure plus flexible et mobile. C'est également au sein de ce site d'interaction que l'on va retrouver la poche à ligand riche en résidus chargés positivement ce qui favorise la fixation de la forme active ATP^{4-} de l'ATP extracellulaire (Figure 31).

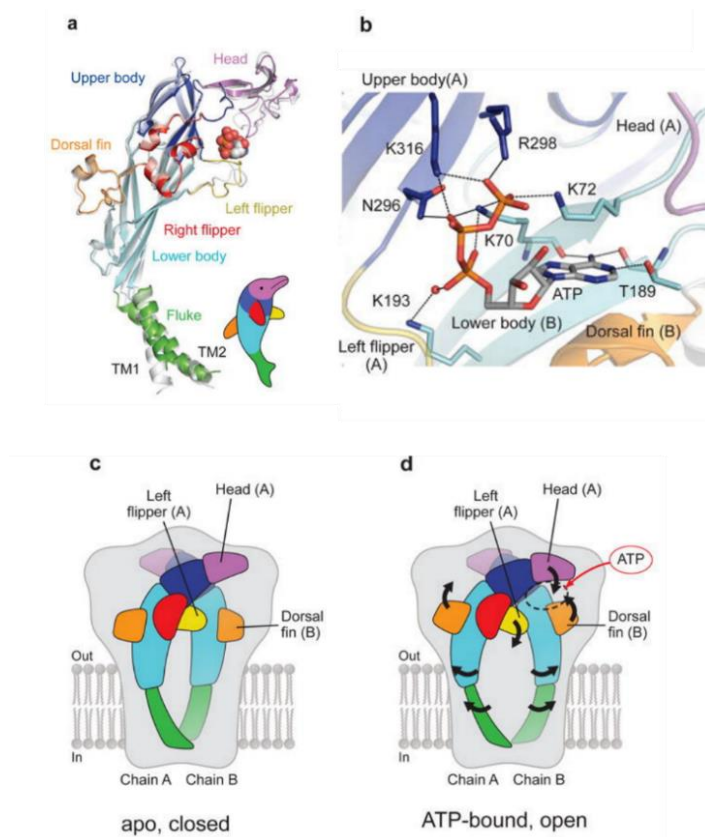


Figure 32 : Cristallographie d'un monomère de P2X7 de poisson zèbre et représentation schématique de P2X7 à la membrane plasmique

a) La cristallographie du monomère de P2X7 a permis la mise en évidence des différentes structures protéiques. Ce monomère a été associé à l'image d'un dauphin afin de plus facilement en décrire les différentes portions. b) Identification des types d'acides aminés et leur position au sein du monomère permettant la formation de la poche à ligand et donc l'interaction du trimère de P2X7 avec son ligand l'ATP⁴⁻. c,d) Représentation schématique du trimère de P2X7 à la membrane en absence (c) ou après fixation de l'ATP (d). La position ouverte (d) résulte d'un changement de conformation permettant la formation du canal cationique, d'après Kawate et al.,[349].

D'un point de vue fonctionnel, une des différences majeures existant entre les sous-types de P2X réside dans leur capacité de réponse à l'ATP extracellulaire. Cette différence dépend à la fois de leur affinité pour l'ATP et de la capacité du récepteur à désensibiliser. L'EC₅₀ des P2X varie ainsi de 0,5 μM d'ATP⁴⁻ pour les plus sensibles, comme P2X5 et P2X6, à environ 10 μM pour les sous-types moyennement sensibles à la stimulation tels que P2X2 et P2X4. Cette sensibilité peut être encore plus faible. En effet, l'EC₅₀ de P2X7 varie de 100 à 150 μM d'ATP⁴⁻ selon le type cellulaire. Contrairement aux autres sous-types, le récepteur P2X7 est incapable de désensibiliser malgré des stimulations maintenues plusieurs minutes (Tableau 2) [305, 306, 350, 351].

Tableau 2 : Expression et caractéristiques biochimiques des différentes isoformes des récepteurs P2X, adapté de [305]

P2X isoform	EC ₅₀ (μM)	Main downstream signalling events	Expression
P2X1	0.05 - 1	Ca ²⁺ and Na ⁺ influx	Smooth muscle, lymphocytes, neurons
P2X2	1 - 30	Ca ²⁺ influx	Pancreatic cells and neurons
P2X3	0.3 - 1	Cation influx	Neurons, keratinocytes
P2X4	1 - 10	Ca ²⁺ influx	Neurons, lymphocytes, macrophages, fibroblasts
P2X5	1 - 10	Ion influx	Neurons, keratinocytes
P2X6	1 - 12	Ion influx	Neurons, keratinocytes
P2X7	≥ 150	Ca ²⁺ and Na ⁺ influx K ⁺ efflux, pore formation, PS externalisation, Metalloprotease activation	Neurons, lymphocytes, macrophages, NK cells, neutrophils

Le récepteur P2X7, malgré sa très forte homologie de structure avec le récepteur P2X4 [352], présente des caractéristiques qui lui sont propres comme sa queue C-terminale de grande taille (240 acides aminés contre 29 à 87 pour les autres isoformes), son incapacité à désensibiliser et sa capacité à former un pore membranaire non sélectif de taille variable [353].

b) Expression et fonctions cellulaires de P2X7

Le récepteur P2X7 est un récepteur ubiquitaire très fortement exprimé au niveau des cellules neuronales et immunitaires, notamment les macrophages et les lymphocytes T. Au sein des glandes submandibulaires de rat, P2X7 est retrouvé à la fois dans et hors des radeaux lipidiques et cette localisation membranaire influence les voies de signalisations cellulaires mises en jeu lors d'une stimulation par l'ATP [354]. Ainsi, après sa synthèse cytoplasmique, l'adressage du récepteur P2X7 à la membrane nécessite une étape de palmitoylation qui pourra être suivie

d'une étape de dépalmitoylation permettant sa sortie des radeaux lipidiques au sein desquels il avait initialement été adressé. Des expériences d'inhibition de la palmitoylation réalisés dans des cellules HEK (human embryonic kidney) transfectées et des cultures primaires de macrophages ont démontré l'importance de cette modification post-traductionnelle dans l'adressage et la localisation membranaire de P2X7. Ainsi une déficience de palmitoylation de P2X7 entraîne sa rétention au niveau du réticulum endoplasmique et sa dégradation protéolytique responsable d'une réduction massive de son taux membranaire [355]. Plus récemment, il a également été montré que la palmitoylation de P2X7 était responsable de son incapacité à désensibiliser après une stimulation par l'ATP [356].

Malgré une faible sensibilité à son ligand, la stimulation de P2X7 par une dose d'ATP⁴⁻ de l'ordre de 0,2 à 0,5 mM entraîne de nombreuses réponses cellulaires dépendantes de la durée de la stimulation (Figure 33). Les voies de signalisations impliquées dans la mise en place de ces réponses cellulaires restent cependant mal comprises. Une stimulation de courte durée, de l'ordre de la milliseconde, induit un changement de conformation du trimère de P2X7 permettant la formation d'un canal cationique responsable d'un influx calcique et sodique et d'un efflux potassique. Une stimulation maintenue quelques secondes va permettre l'externalisation de phosphatidylsérines de la bicouche lipidique interne de la membrane plasmique vers la bicouche externe. Cette externalisation est réversible et n'est donc pas impliquée dans les processus d'apoptose. Une stimulation de plus longue durée par l'ATP⁴⁻ extracellulaire, de l'ordre de la minute, permet l'ouverture d'un pore non sélectif de taille élevée mais variable selon le type cellulaire. Ainsi, dans les macrophages le pore P2X7 permet le passage de molécules dont la taille peut atteindre 900 Da contre 600 Da dans le lymphocyte T. Le processus de formation du pore non sélectif reste mal défini. Il a d'abord été suggéré que sa formation était dépendante de l'interaction entre P2X7 et la protéine canal pannexine 1. Cependant, chez des souris génétiquement déficientes pour la pannexine 1, le récepteur P2X7 conserve capacité à former un pore non sélectif [357]. L'anoctamine 6, une protéine aux fonctions multiples, a également été impliquée dans les différentes fonctions cellulaires de P2X7. Son inhibition ou sa déficience génétique ne permet cependant pas d'inhiber totalement ses réponses cellulaires [358]. Il est intéressant de noter que des protéoliposomes portant P2X7 à leur surface était capable de former un pore non sélectif en réponse à l'ATP⁴⁻ ce qui suggère que la formation du pore découle de la dilatation du canal cationique P2X7 [348]. L'activation

de P2X7 par l'ATP⁴⁻ permet également l'activation des métalloprotéases de membrane, ADAM 10 et ADAM 17 (A Disintegrin And Metalloproteinase 10 ou 17), responsables du clivage de protéines transmembranaires tels que la L-selectine (CD62L), le récepteur de basse affinité aux IgE (CD23) et le précurseur de la protéine amyloïde (AAP : Amyloid precursor protein) [83, 84]. Enfin, une stimulation de P2X7 d'une durée ≥ 30 minutes permet la formation de « blebs » membranaires et la mort des cellules par un mécanisme d'apoptose ou d'apoptose selon le type cellulaire [353, 359-361].

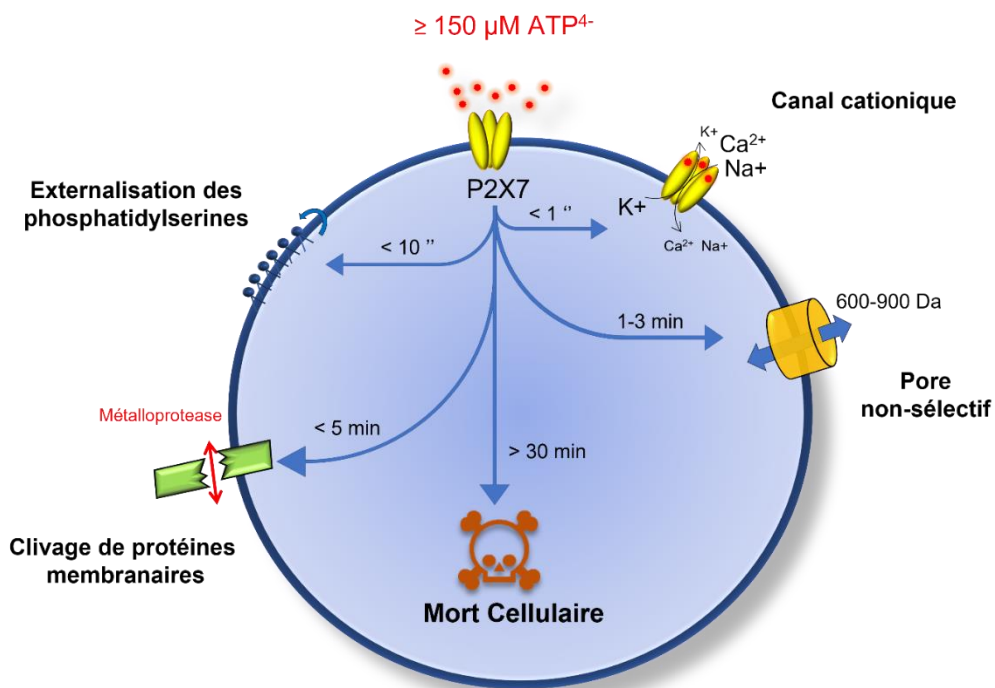


Figure 33 : Fonctions cellulaires de P2X7 en réponse à une stimulation par l'ATP⁴⁻

Le récepteur P2X7 induit différentes réponses cellulaires en fonction du temps de stimulation par l'ATP⁴⁻. La fixation de l'ATP⁴⁻ entraîne immédiatement, par changement de conformation du trimère, l'ouverture du canal cationique. Le pore non sélectif est ensuite formé après 1 à 3 minutes de stimulation, suivi de l'activation des métalloprotéases de membrane et de l'externalisation réversible des phosphatidylsérines. Enfin, une stimulation maintenue ≥ 30 minutes va induire la mort cellulaire par apoptose.

c) Différences de sensibilité de P2X7 en fonction des sous-types de lymphocytes T

Les lymphocytes T CD8⁺ présentent une réponse plus faible que les lymphocytes T CD4⁺ à une stimulation par la même dose d'ATP⁴⁻. À l'inverse, les Treg présentent une plus grande sensibilité à l'ATP⁴⁻ que les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels, en accord avec leur taux plus élevé d'expression membranaire de P2X7. Cependant, dans les lymphocytes T conventionnels, pour le même taux d'expression membranaire, on observe des différences de sensibilité à

l'ATP⁴⁻ en fonction de leur état d'activation et de différenciation. Par exemple, les lymphocytes T récemment activés (CD69⁺) perdent la capacité à cliver CD62L sans pour autant présenter d'altération des autres fonctions cellulaires associés à la stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ [2]. De plus, les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires de phénotype CD44^{high}CD45^{high} présentent une très faible réponse à la stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ comparé aux lymphocytes T CD8⁺ naïfs CD44^{low}CD45^{high} malgré des taux similaires d'expression membranaire de P2X7. Enfin, on observe une diminution de la sensibilité à l'ATP⁴⁻ entre les CD4 effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45^{low} et les CD4 naïfs CD44^{low}CD45^{high} [3]. Les fonctions cellulaires induites par l'activation de P2X7 ne répondent donc pas à une loi du tout ou rien puisqu'elles sont différenciellement modulées par le phénotype de la cellule. Les mécanismes sous-jacents à ces variations de réponses cellulaires restent cependant à être déterminé et feront l'objet de cette thèse.

3. Cholestérol membranaire

Le cholestérol est un lipide amphiphile synthétisé chez les mammifères par toutes les cellules de l'organisme. Il est majoritairement retrouvé au sein de la membrane plasmique (60 à 90 % du cholestérol libre) dans laquelle il joue un rôle d'organisateur. Sa structure unique composée d'une partie polaire rigide et d'une queue hydrophobe beaucoup plus flexible lui permet de s'intégrer au sein des membranes plasmiques par interaction avec les phospholipides la composant. Plus les phospholipides comportent une proportion élevée d'acides gras saturés, plus la bicouche lipidique tend à se figer du fait du nombre important d'interactions intermoléculaires entre les chaînes aliphatiques d'acides gras. À l'inverse, en présence d'une forte proportion d'acides gras insaturés, les membranes tendent à se fluidifier en raison des doubles liaisons dans les chaînes latérales aliphatiques qui brisent leur régularité et les empêchent de s'organiser parallèlement entre elles (Figure 15). D'autre part, le groupe hydroxyle du cholestérol va créer une liaison hydrogène avec l'oxygène du groupe carbonyle des phospholipides et réduire leur possibilité d'interaction. Cette interaction cholestérol-phospholipide va fortement réduire la dynamique des phospholipides membranaires et stabiliser les membranes plasmiques. Lorsque le cholestérol est associé à d'autres lipides, notamment les sphingolipides ou des protéines ancrées à la membrane par des

glycosylphosphatidylinositol (ancres GPI), il permet la formation de microdomaines membranaires dynamiques impliqués dans la régulation des trafics de protéines membranaires, la transduction de signaux cellulaires ou les interactions hôtes-pathogènes. Les zones membranaires d'interaction entre le cholestérol et les sphingolipides sont ainsi dénommés phases liquides ordonnées (Lo) par opposition aux phases liquides désordonnées (Ld) qui ne contiennent que peu ou pas de cholestérol (Figure 34) [362, 363].

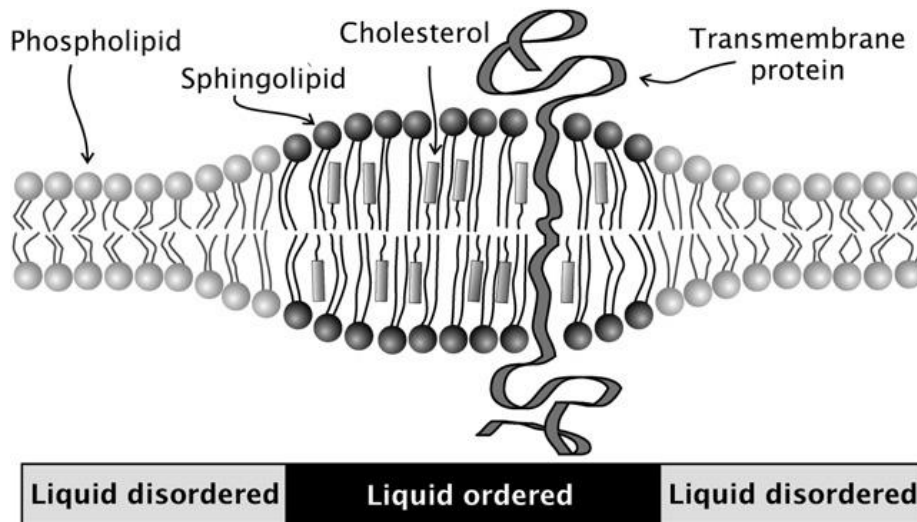


Figure 34 : Schéma de l'intégration du cholestérol au sein des membranes plasmiques

Deux types de domaines sont décrit au sein de la membrane plasmique, présentant des caractéristiques de fluidité et de rigidité différentes. Les domaines « désordonnés » (Ld) sont enrichis en phospholipides insaturés et pauvre en cholestérol. À l'inverse, les domaines « ordonnés » (Lo) sont enrichis en cholestérol et en sphingolipides saturés.

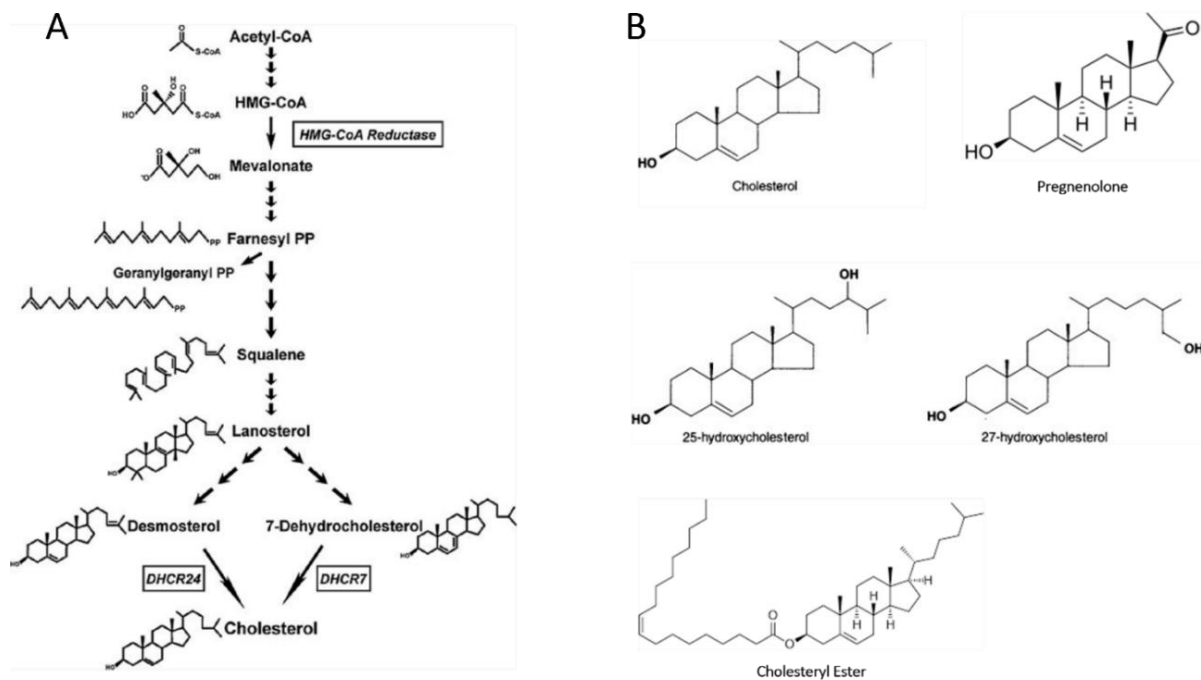


Figure 35 : Voie de biosynthèse métabolique du cholestérol et structure de ses dérivés

La partie A présente les étapes majeures de la synthèse du cholestérol ainsi que la structure des différents précurseurs du cholestérol. La partie B présente la structure du cholestérol ainsi que celle de certains de ces dérivés, notamment la prégnénolone précurseur des hormones stéroïdiennes, les 25 et 27 hydroxycholestérols qui sont les oxystérols les plus communs et un cholestérol estérifié qui représente la forme de stockage et de transport du cholestérol.

Enfin, le cholestérol entraîne des changements de dynamique membranaire à l'échelle de l'ensemble de la membrane plasmique puisque l'on observe des zones de compartimentation due à l'interaction préférentielle du cholestérol avec les phospholipides et sphingolipides à longues chaînes saturées. Au sein des radeaux lipidiques, on retrouve ainsi une forte proportion de cholestérol ainsi que des sphingomyélines à la bicouche lipidique externe de la membrane plasmique et des glycosphingolipides saturés à la bicouche interne (Figure 36) [364, 365].

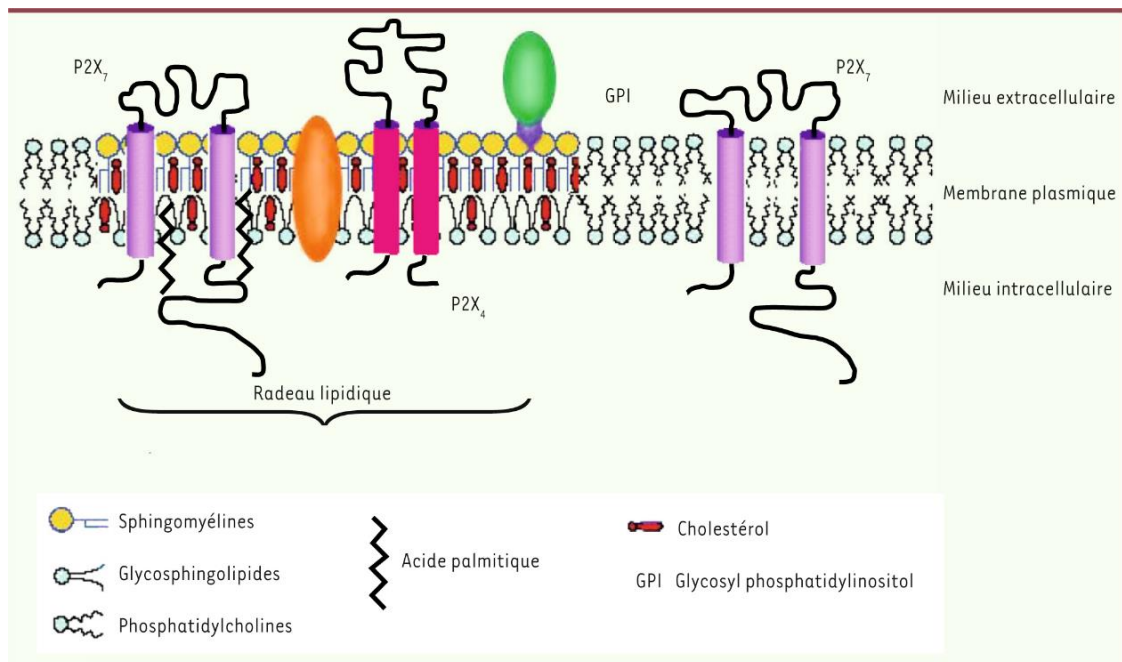


Figure 36 : Influence du cholestérol et des sphingolipides sur la fluidité et la rigidité membranaire

La membrane plasmique est compartimentée par des compositions lipidiques différentes. Ainsi une forte majorité de phosphatidylcholine insaturées est retrouvée hors des radeaux lipidiques. À l'inverse la bicouche externe des radeaux lipidiques est composée de sphingomyélines et la bicouche interne de glycosphingolipides saturés. Le cholestérol quant à lui est enchâssé dans les deux bicouches lipidiques des radeaux. Le récepteur P2X7 est au sein des radeaux lipidiques lorsqu'il est palmitoylé et en dehors après dépalmitoylation, d'après Pochet et al., [366].

En plus de son rôle d'organisateur de la membrane plasmique, le cholestérol est le précurseur métabolique de nombreuses molécules. Il peut ainsi être oxydé pour former des oxystérols (Figure 35) eux-mêmes utilisés pour la synthèse d'acide biliaires ou de prégnénolone (Figure 35), un précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdiennes [367]. Du fait de son rôle pléiotrope au sein de l'organisme, les dérégulations de la synthèse et de l'homéostasie du cholestérol sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Le cholestérol est ainsi une cible d'intérêt pour l'étude de pathologies aussi variées que le cancer, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et certaines pathologies auto-immunes comme le diabète [368, 369].

a) Synthèse du cholestérol

Le taux de cholestérol est finement régulé et réside dans un équilibre entre la synthèse *de novo*, le stockage intracellulaire et les échanges entre la cellule et la circulation sanguine.

i. Synthèse par la voie endogène

La synthèse *de novo* du cholestérol peut être initiée au sein de tous les types cellulaires mais a majoritairement lieu dans le foie ($\approx 50\%$ de la production totale) à partir de l'acétyl-CoA obtenu

par la dégradation des glucides et des acides gras. Au sein de la vingtaine d'enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse, l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase joue un rôle essentiel dans la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate. C'est d'ailleurs cette enzyme qui est ciblée par les statines qui sont les molécules hypocholestérolémiantes les plus utilisées en thérapie. La deuxième enzyme limitante au sein de cette voie de biosynthèse est la squalène monooxygénase, impliquée dans la transformation du squalène en 2,3-époxy-squalène, précurseur des produits stéroïdes (Figure 35 et 37) [364, 370-372].

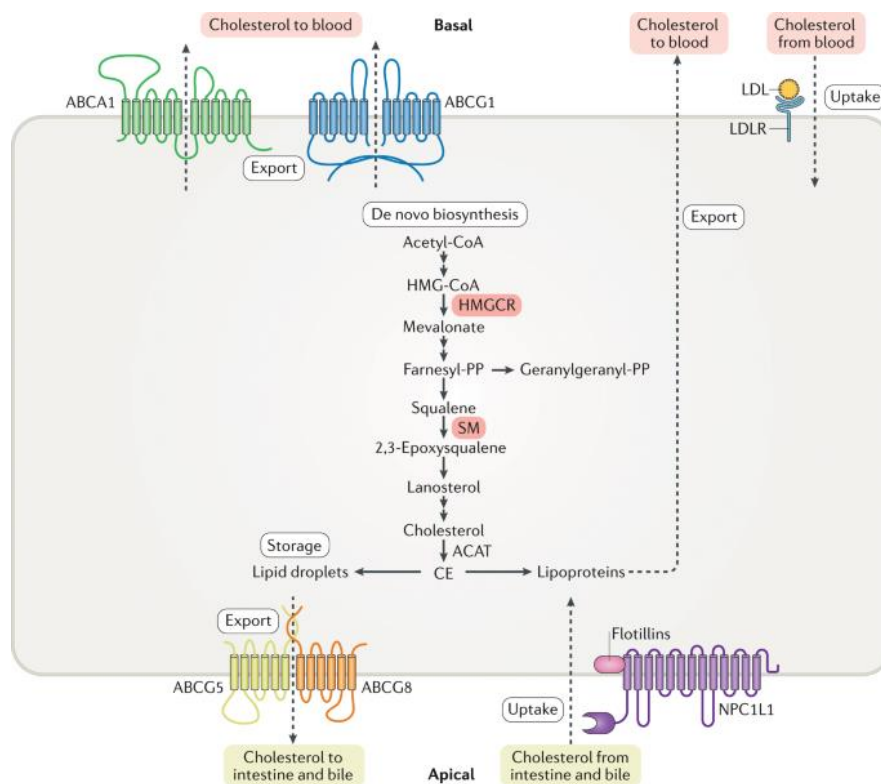


Figure 37 : Métabolisme du cholestérol

Différentes voies modulent le taux de cholestérol au sein des cellules. Il peut être synthétisé à partir de l'acétyl-CoA ou bien importé depuis la circulation sanguine par les récepteurs aux LDL ou les NPC1L1. Dans le cas d'un taux de cholestérol intracellulaire trop élevé, il est stocké sous forme de gouttelettes lipidiques ou exporté vers le milieu extracellulaire, d'après Luo et al., [364].

La biosynthèse du cholestérol est directement régulée par le facteur de transcription SREBP2 (Sterol regulatory element-binding protein 2) localisé à la membrane du réticulum endoplasmique et qui va agir comme un senseur du taux de cholestérol intracellulaire. En cas d'une diminution de ce taux intracellulaire, le complexe formé des protéines SCAP (SREBP clivage activating protein) et SREBP2 va perdre sa capacité d'association avec la membrane du réticulum. Le complexe va alors migrer jusqu'à la membrane de l'appareil de Golgi où il va subir

deux étapes successives de clivages par les protéases S1P et S2P. La protéine SREBP2 clivée et active va alors migrer au noyau afin d'initier l'expression des enzymes clés (HMG-CoA réductase et squalène monooxygénase) de la synthèse *de novo* du cholestérol mais aussi celle du récepteur aux LDL (LDLR) responsable de l'import de cholestérol exogène. Les oxystérols jouent également un rôle dans cette régulation métabolique. Dans le cas d'un fort taux d'oxystérols intracellulaires (tel que 25/27-hydroxycholestérol), la protéine INSIG va s'associer au complexe SCAP-SREBP2 et forcer sa rétention à la membrane du RE [178]. La liaison des oxystérols avec le facteur de transcription LXR (liver X receptor) va induire l'expression d'ABCG1 responsable de l'efflux de cholestérol et inhiber celle des récepteurs aux LDL [373, 374]. Enfin, certains oxystérols, notamment le 25-hydroxycholestérol, peuvent activer la synthèse de l'enzyme ACAT (acyl-CoA cholestérol acyltransférase), responsable de l'estérification du groupement hydroxyle du cholestérol par une longue chaîne d'acide gras (Figure 35), et induire la dégradation de l'HMG-CoA réductase par le protéasome [178, 375-379] (Figure 38).

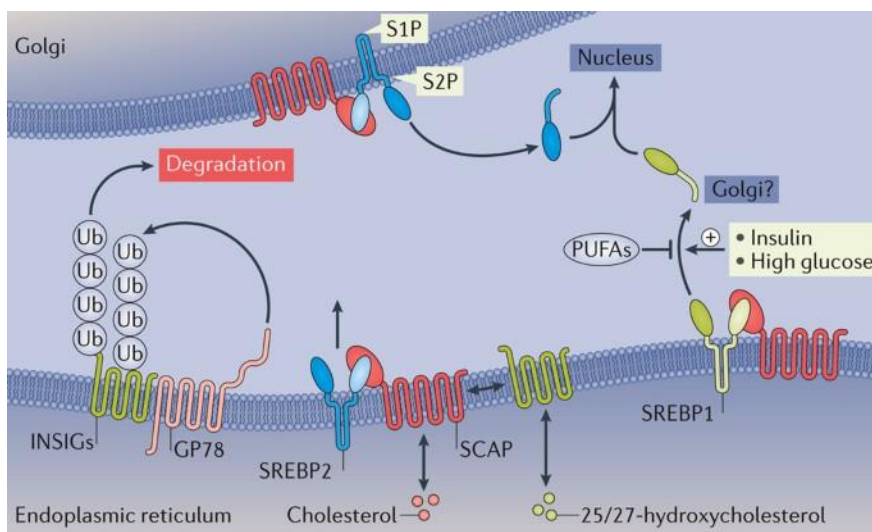


Figure 38 : Régulation du taux de cholestérol

La régulation du taux de cholestérol intracellulaire est très stricte. Le complexe SCAP-SREBP exprimé à la membrane du RE joue un rôle de senseur. Une fois clivé à la membrane du golgi, la sous-unité S2P de SREBP2 va migrer au noyau pour réguler l'expression de l'enzyme HMG-CoA réductase, d'après Shimano et al., [380].

ii. Apport par la voie exogène

La deuxième voie permettant un apport de cholestérol au sein des cellules est la voie exogène, c'est-à-dire dépendante d'un apport alimentaire. Dans le cas par exemple d'un manque en Acétyl-CoA dû à un jeûne, la cellule stimule l'import de cholestérol depuis la circulation sanguine grâce aux LDL (low density lipoproteines) et leur récepteur membranaire le LDLR d'expression ubiquitaire. Les LDL permettent la capture du cholestérol circulant et leur transport vers les cellules. Ces protéines de transport permettent donc à la fois de réduire le taux de cholestérol circulant et d'importer du cholestérol exogène aux cellules. Les cellules

hépatiques, dont l'un des rôles est d'assurer le stockage du cholestérol, expriment d'ailleurs très fortement les récepteurs aux LDL [381]. La partie N-terminale des LDLR possèdent des domaines de reconnaissance aux apolipoprotéines ApoB et ApoE qui sont des composants majeurs des LDL. L'interaction des LDL chargés en cholestérol avec leur récepteur entraîne la formation d'une vésicule d'endocytose dépendante des clathrines. La diminution du pH au sein de cet endosome va entraîner la dissociation du complexe LDL-LDLR [382]. Le récepteur au LDL sera recyclé et réadressé à la membrane, les LDL quant à eux seront dégradés au sein du lysosome ce qui permettra la libération du cholestérol estérifié et son hydrolyse en cholestérol libre [364, 383, 384]. La sortie du cholestérol des lysosomes est dépendante des protéines de la famille NPC (Nieman Pick Type C). NPC 2 est une petite protéine soluble capable de fixer le cholestérol libre et de le transférer à la protéine membranaire lysosomal NPC 1 qui va permettre son adressage vers le RE. Des mutations perte de fonction touchant NPC 1 ou 2 entraînent une accumulation pathologique de cholestérol lysosomal caractéristique de la maladie de Nieman-Pick [385, 386]. Après passage dans le RE, un senseur du taux de cholestérol libre, celui-ci pourra être adressé à la membrane plasmique ou envoyé vers des voies plus spécialisées : stockage sous forme de gouttelettes lipidiques, efflux ou métabolisation. Dans le cas d'une augmentation trop importante du taux de cholestérol cellulaire, la protéine cytosolique PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) joue le rôle de régulateur négatif du taux de LDLR à la membrane cellulaire et donc de l'import de cholestérol. Ainsi, le relargage autocrine de PCSK9 dans le milieu extracellulaire et sa fixation sur les LDLR va entraîner l'endocytose du complexe LDLR-PCSK9, inhiber la voie de recyclage et de réadressage à la membrane des LDLR et les envoyer vers la dégradation lysosomales [387, 388]. Le pool de LDLR membranaire va ainsi progressivement diminuer réduisant la capacité de la cellule à importer le cholestérol présent en circulation. L'expression par la cellule de PCSK9 est régulée par le facteur de transcription SREBP2 également responsable de la régulation de la biosynthèse du cholestérol (Figure 39).

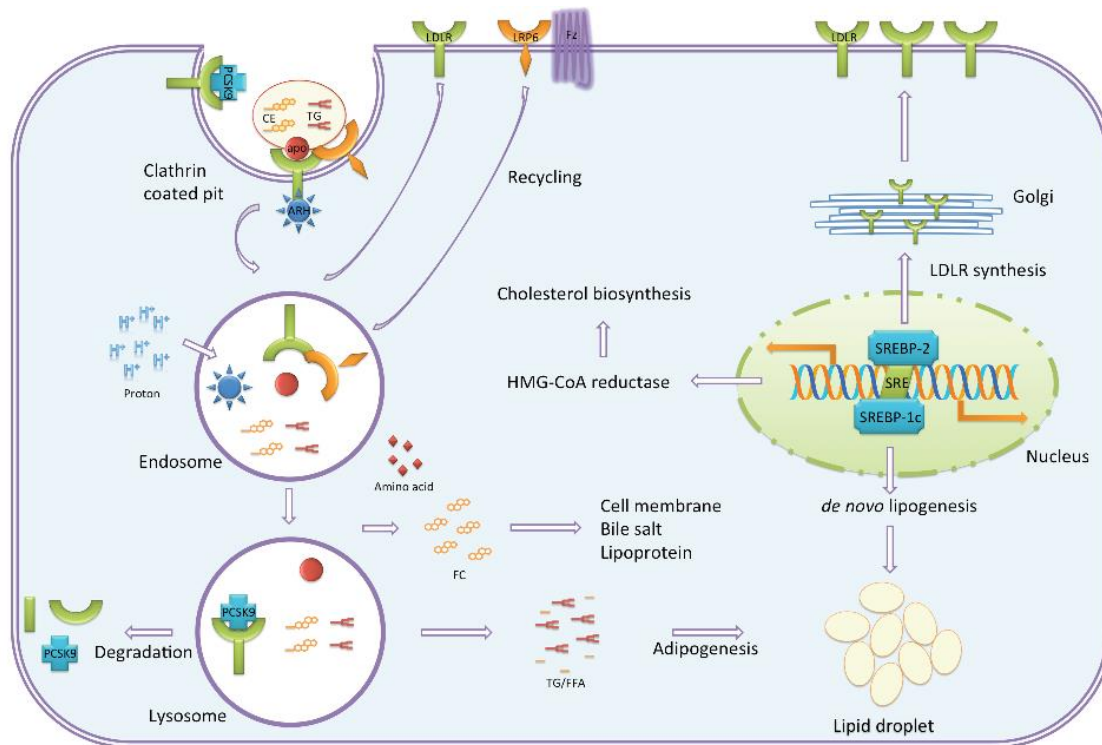


Figure 39 : Mécanisme cellulaire d'import de cholestérol

Dans le cas d'un besoin accru en cholestérol, ne pouvant pas être assuré par la synthèse de novo, la cellule peut mettre en place un import depuis la circulation via les récepteurs aux LDL. Les LDLR vont capturer les lipoprotéines de basse densité (LDL) circulantes par interaction avec leur composant ApoB ou ApoE. L'intégration du cholestérol va être initiée par endocytose dépendante des clathrines du complexe LDL-LDLR. La dissociation du complexe LDL-LDLR ainsi que la reconversion des esters de cholestérol en cholestérol libre à lieu dans les endosomes par acidification. Les LDLR seront ensuite recyclés à la membrane ou bien dégradés s'ils sont associés à la protéine régulatrice PCSK9, d'après Go et al., [384].

iii. Régulation du taux de cholestérol par efflux ou stockage intracellulaire

À l'exception des hépatocytes et des cellules productrices d'hormones stéroïdiennes, les cellules de mammifères ne sont pas capables de cataboliser le cholestérol. Le cholestérol sous forme libre peut s'avérer toxique pour la cellule dans le cas d'une augmentation non contrôlée de son taux intracellulaire. Le maintien de l'homéostasie du cholestérol est donc essentiel pour la survie de la cellule. Celui-ci se fait soit par efflux du cholestérol vers la circulation sanguine soit par son stockage intracellulaire sous forme de gouttelette lipidiques. L'étape d'estérification est donc essentielle pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol. En cas d'une trop forte accumulation de cholestérol intracellulaire, il sera concentré à la membrane plasmique créant une déstabilisation de certains domaines membranaires et la mort cellulaire. L'efflux de cholestérol est dépendant des transporteurs ABC (ATP binding cassette) dont les

plus représentés dans l'organisme sont le transporteur ABCA1 ubiquitaire (ABC sub family A member 1) et le transporteur ABCG1 qui est exprimé majoritairement par les macrophages [389-391]. Ils capturent le cholestérol intracellulaire et lui font passer la membrane plasmique libre par l'intermédiaire des accepteurs ApoA-I et ApoA-II synthétisés et sécrétés par les hépatocytes et les entérocytes et constituant les HDL. Lors de son interaction avec le transporteur de membrane ABCA1, ApoA-I acquière des phospholipides et un peu de cholestérol libre ce qui lui permet de former la lipoprotéine immature de haute densité nommée pré- β -HDL. Celle-ci rejoindra ensuite la circulation sanguine où elle pourra capturer du cholestérol libre issu majoritairement du macrophage et l'estérifier sous l'action de l'enzyme LCAT (lecithine : cholestérol acyltransferase) et atteindre l'état HDL-mature qui pourra alors augmenter sa capacité de charge en cholestérol provenant d'autres types cellulaires via le transporteur ABCG1 [392, 393] (Figure 39, 40 et 41).

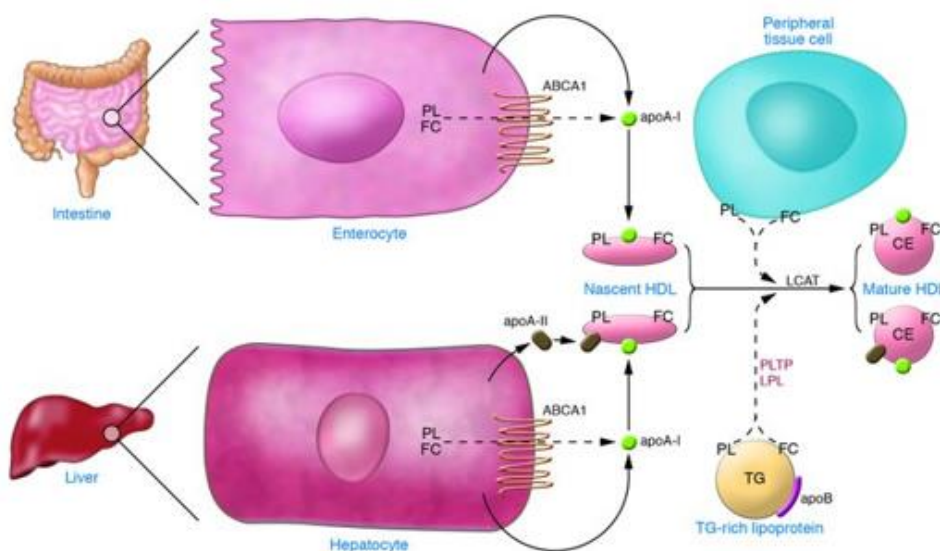


Figure 40 : Formation des HDL et export du cholestérol

Les apolipoprotéines ApoA-I et II nécessaires à la formation des HDL sont synthétisés par les entérocytes et les hépatocytes et sécrétés vers le milieu extracellulaire. Ces ApoA sont ensuite associés au cholestérol libre exporté via les transporteurs ABCA1 pour former des HDL immatures. Ces HDL immatures vont ensuite pouvoir capter le cholestérol exporté par d'autres cellules périphériques, avant leur maturation dépendante de la LCAT permettant l'estérification du cholestérol, d'après Phillips et al., [394].

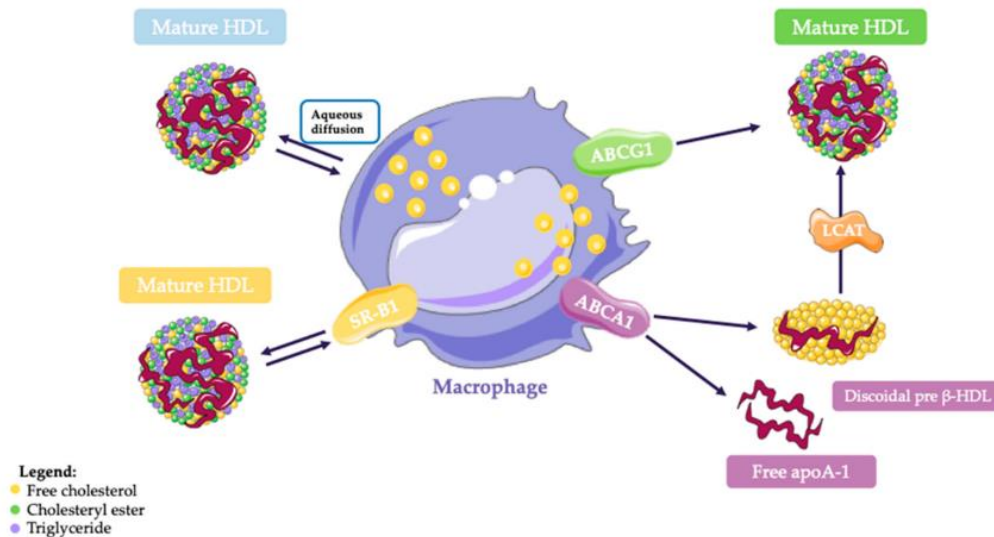
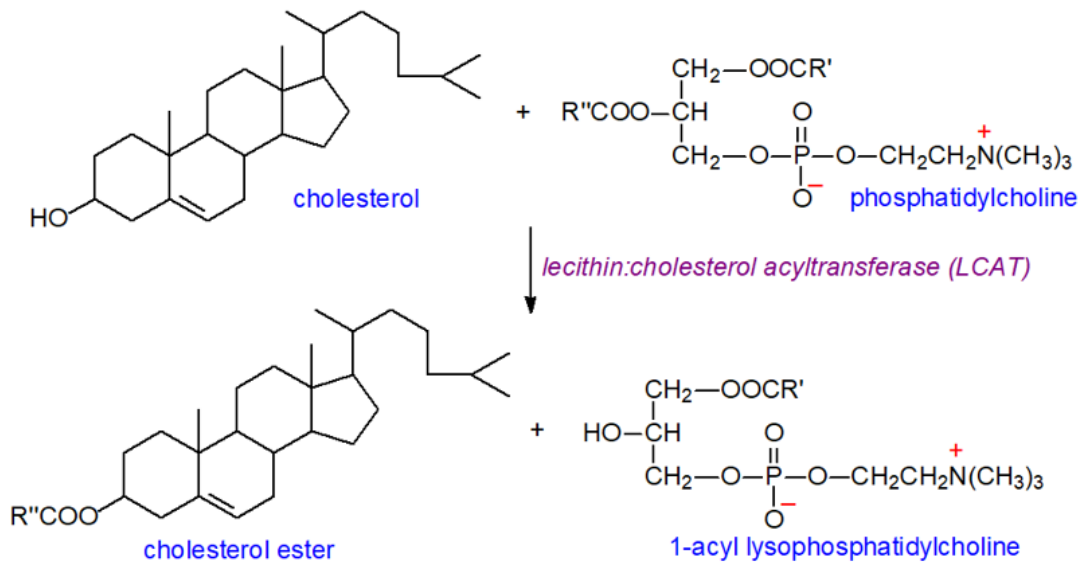


Figure 41 : Différentes voies d'échanges de cholestérol entre le macrophage et les HDL

Le macrophage joue un rôle très important dans la gestion des taux de cholestérol circulant. Il peut via la synthèse d'apoA-I et l'expression à sa membrane du transporteur ABCA1, générer des HDL immatures. Il exprime également le transporteur ABCG1 par lequel il peut induire un efflux de cholestérol vers les HDL matures. De plus, il peut jouer un rôle d'accepteur des HDL via le récepteur SR-B1 ou bien par diffusion à travers la membrane, d'après Adorni et al., [389].

Une fois matures et chargés en cholestérol, les HDL circulants vont migrer jusqu'au foie où ils seront internalisés par l'intermédiaire du récepteur SR-B1 (scavenger receptor class BI) et déchargés de leur cholestérol estérifié puis resecrétés sous leur forme « immature » non chargée. Le cholestérol estérifié sera ensuite hydrolysé en cholestérol libre par la cholestérol-estérase et soit excrété dans la bile soit transformé en acide biliaire [364]. Chez l'Homme, une voie alternative permet, à l'aide de la protéine CETP (cholesteryl ester transfert protein), de transférer du cholestérol estérifié des HDL aux LDL ou aux VLDL (very low density lipoprotein). Les LDL et VLDL seront ensuite endocytés par les LDLR des hépatocytes et le cholestérol qu'ils contiennent sera éliminé par la voie d'excrétion biliaire [395-397]. L'absorption du cholestérol par l'intestin de même que son stockage intracellulaire dans des gouttelettes lipidiques nécessite son estérification par l'enzyme ACAT (Acyl-Coa Cholestérol Acyl Transférase) (Figure 41). ACAT existe sous deux isoformes, ACAT 1 et ACAT 2, dont l'expression est dépendante du type cellulaire. ACAT 1 est ubiquitaire avec une surexpression dans les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules productrices d'hormones stéroïdiennes alors que ACAT 2 est majoritairement retrouvée dans les entérocytes et dans une moindre mesure dans les hépatocytes [398-400].

Biosynthesis of cholesterol esters - in plasma



Biosynthesis of cholesterol esters - in cells

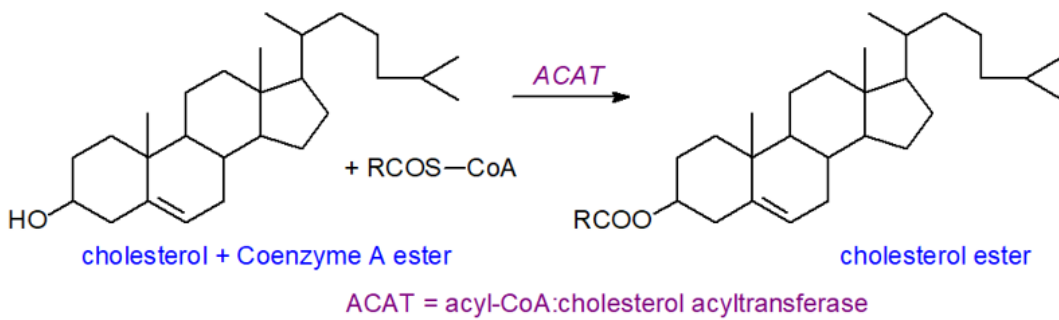


Figure 42 : Structure des esters de cholestérol formé en intracellulaire ou dans le plasma sanguin

L'estérification du cholestérol est dépendante de deux enzymes différentes selon la localisation des molécules cibles. Dans la circulation plasmatique, l'estérification sera dépendante de LCAT (lecithin cholestérol acyltransférase) alors qu'elle passera par l'action de ACAT (Acyl-Coa cholestérol acyltransférase) en intracellulaire.

II. Objectifs

Notre équipe a mis en évidence l'importance du récepteur P2X7 dans la régulation de l'homéostasie des lymphocytes T effecteurs en synergie avec le récepteur d'apoptose Fas. Chez les souris B6/*lpr*, qui présentent une lymphoaccumulation et un syndrome lupique modéré, la déficience en P2X7 amplifie considérablement ces pathologies pour atteindre une sévérité similaire à celle des souris MRL/*lpr*. D'autre part, notre laboratoire a montré que les réponses cellulaires induites par l'activation de P2X7 dans les lymphocytes T normaux dépendaient de leur état d'activation et de différenciation et non pas du taux d'expression en récepteur P2X7 à la membrane plasmique. Il existe ainsi des différences de sensibilité à l'ATP entre les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mais également entre les lymphocytes T naïfs, effecteurs et mémoires.

L'objectif de mes travaux de thèse a donc été d'identifier les principaux acteurs responsables de la sensibilité de P2X7 à l'ATP⁴⁻ en conditions normales et pathologiques en particulier dans le cas des pathologies auto-immunes de type lupique. Le taux de cholestérol membranaire est connu pour influencer la formation des radeaux lipidiques membranaires et la fonctionnalité de nombreux récepteurs membranaires, de plus, son taux est très fortement modulé au cours de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T. Nous avons ainsi posé l'hypothèse que le cholestérol membranaire pourrait être un des acteurs responsables des différences de réponses cellulaires à la stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ observés dans les différentes sous-populations lymphocytaires T normales ou pathologiques.

Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié dans les lignées lymphocytaires T EL4 et L1210 et dans différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ issus de souris normales C57BL/6 (B6), les taux de cholestérol membranaire, les proportions de radeaux lipidiques à la membrane plasmique et les taux d'expression en gangliosides GM1 par cytométrie en flux et dosages enzymatiques. Nous avons également modulé les taux de cholestérol membranaire *in vitro* et *ex vivo* afin d'évaluer son influence sur la sensibilité de P2X7 à l'ATP⁴⁻ et sa localisation membranaire ainsi que le lien existant entre la capacité de P2X7 à induire les fonctions cellulaires en réponse à son ligand et sa présence dans ou hors les radeaux lipidiques. Les membranes plasmiques des lymphocytes T normaux et tumoraux ont donc été déplétées en cholestérol membranaire par utilisation de l'accepteur hydrophobe méthyl-β-

cyclodextrine (MBCD) mais aussi par des méthodes plus « physiologiques » comme l'inhibition de la synthèse endogène de cholestérol en cultivant les lignées lymphocytaires en présence de statines ou dans un milieu de culture délipidé afin de réduire l'apport exogène de cholestérol. À l'inverse, nous avons augmenté le taux de cholestérol membranaire des lymphocytes T par chargement *in vitro* à l'aide de complexes MBCD/Cholestérol et testé la capacité de ces cellules à répondre à une stimulation par l'ATP⁴⁻. En parallèle, des souris normales B6 ont été soumises à une diète enrichie en lipides et supplémentée en cholestérol afin d'évaluer l'influence du cholestérol circulant d'origine alimentaire sur le phénotype et la proportion des sous-populations lymphocytaires T ainsi que leur sensibilité à l'ATP⁴⁻. Enfin, des souris B6/*lpr* présentant un phénotype lupique modéré comparé aux souris auto-immunes MRL/*lpr* et au nouveau modèle de souris lupique développé par notre équipe (B6/*lpr*-P2X7KO) sont également soumises à une diète enrichie en lipides et supplémentée en cholestérol afin d'évaluer l'influence des taux de cholestérol circulant et membranaire sur la sévérité de la lymphoaccumulation de lymphocytes T pathogéniques CD90⁺ B220⁺ CD4⁻CD8⁻ et des atteintes auto-immunes de type lupique.

ARTICLES

III. P2X7 receptor activation by extracellular ATP in mouse T-cell lines depends on its plasma membrane localization driven by membrane cholesterol content

Tom Hutteau-Hamel, Amine Mellouk, Olivier Dellis, Jean M Kanellopoulos, Pierre Bobé

L'impact du taux de cholestérol membranaire sur les fonctions cellulaires induites par l'ATP⁴⁻ a été essentiellement étudié dans des lignées cellulaires transfectées par P2X7. Pour mieux comprendre le rôle du cholestérol membranaire dans la sensibilité à l'ATP⁴⁻ extracellulaire des lymphocytes T non transfectés, nous avons sélectionné parmi un panel de lignées lymphocytaires T de souris, les lymphocytes T tumoraux EL4 et L1210 pour leur taux équivalent d'expression membranaire de P2X7 mais leur capacité opposée à déclencher l'ouverture du canal, la formation du pore et l'externalisation des phosphatidylsérines en réponse à une stimulation par l'ATP⁴⁻. Comparé aux cellules EL4, les cellules L1210 résistantes à l'ATP⁴⁻ possèdent une membrane plasmique qui contient des niveaux significativement plus élevés de cholestérol et de gangliosides GM1 résidant dans les radeaux lipidiques. De façon intéressante, les cellules EL4 sont rendu partiellement réfractaires à la stimulation par l'ATP⁴⁻ en augmentant leur taux de cholestérol membranaire à l'aide d'un traitement par le complexe méthyl- β -cyclodextrine/Cholestérol (MBCD/Cholestérol). À l'inverse, les cellules L1210 sont rendues sensibles à l'ATP⁴⁻ en diminuant leur taux en cholestérol membranaire. Dans les cellules EL4 chargées en cholestérol et les cellules L1210 non traitées, le récepteur P2X7 est retrouvé principalement localisé dans les radeaux lipidiques ce qui n'est pas le cas dans les cellules L1210 déplétées en cholestérol ou des cellules EL4 non traitées. En conclusion, notre étude établit un lien direct entre la sensibilité des lymphocytes T à l'ATP⁴⁻ extracellulaire et la localisation de P2X7 dans ou hors les radeaux lipidiques.

P2X7 receptor activation by extracellular ATP in mouse T-cell lines depends on its plasma membrane localization driven by membrane cholesterol content

Tom Hutteau-Hamel¹, Amine Mellouk¹, Olivier Dellis², Jean M Kanellopoulos³, Pierre Bobé^{1,*}

¹ INSERM, Université Paris-Saclay, UMR 996, 92140 Clamart, France,

² INSERM, Université Paris-Saclay, UMR 1193, 91400 Orsay, France

³ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

Running title: Membrane cholesterol content regulates P2X7 function in T cells

Keywords: Purinergic signaling, P2X7 receptor, ATP, Cholesterol, Lipid raft, Gangliosides GM1

* **Correspondence to:** Pierre Bobé; UMR 996 INSERM, Université Paris-Saclay, 32 rue des carnets 92140 Clamart, France phone: +331 41 28 80 03; Fax: +331 46 32 79 93; e-mail: pierre.bobe@universite-paris-saclay.fr

Abbreviations: Ab, antibody; mAb, monoclonal antibody, CTB, Cholera toxin B subunit; DRM, Detergent resistant membrane; eATP, extracellular ATP; FCS, fetal calf serum; GM1, ganglioside 1; MBCD, Methyl- β -Cyclodextrin; MFI, Median fluorescent intensity

Abstract (237 mots)

Previously, we have reported that the sensitivity to extracellular ATP (eATP) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells depends more on their stage of activation and differentiation than on P2X7 membrane expression levels. Various studies reported that membrane cholesterol levels fluctuate during T-cell differentiation. However, the impact of membrane cholesterol content on eATP-induced cellular functions had been mostly evaluated in P2X7-transfected cells. To gain insight into the role of membrane cholesterol in the sensitivity to eATP of T cells expressing basal P2X7 levels, we have selected the mouse EL4 and L1210 leukemic T-cell lines for their similar high levels of P2X7 membrane expression but opposite ability to trigger channel opening, pore formation and phosphatidylserine exposure upon eATP stimulation. Interestingly, we found that plasma membrane of eATP-resistant L1210 cells contained significantly higher levels of cholesterol and lipid raft-resident GM1 gangliosides than eATP-highly sensitive EL4 cells. Importantly, EL4 and L1210 T cells were rendered resistant and sensitive to eATP stimulation by increasing and decreasing their membrane cholesterol content using Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) loaded or not with cholesterol. In MBCD/cholesterol-treated EL4 and untreated L1210 cells, but not MBCD-treated L1210 or untreated EL4 cells, P2X7 was found to mainly localize within lipid rafts. To conclude, the present study highlights that the sensitivity of T cells to eATP is directly dependent of their membrane cholesterol content, while P2X7 membrane localisation plays a lesser role in the regulation of eATP-induced cellular functions in T cells.

Introduction

The adenosine triphosphate (ATP)-gated cation channel P2X7 plays a major role in various innate and adaptive immunity processes, such as the maturation of proinflammatory cytokines [401], the proteolytic cleavage of ectodomains [402, 403], and the activation of T cells [403]. The diversity of functional outcomes of ATP stimulation means that the regulation of P2X7 is critical. Indeed, detrimental and protective effects of P2X7 on inflammatory and autoimmune diseases have been reported [404-408]. Thus, P2X7 activation can induce the differentiation of conventional and regulatory CD4⁺ T cells into pro-inflammatory Th17 cells during chronic inflammation [230, 409-411]. In contrast, we have recently found that the ATP/P2X7 pathway together with the Fas apoptotic pathway protects against the development of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) and systemic lupus erythematosus by regulating effector/memory T-cell homeostasis (Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, *Front. Immunol.*, 2022).

The P2X7 receptor gene is highly polymorphic. Thus, various single-nucleotide polymorphisms (SNP) and splice variants have been described in mouse and human gene as having effects on P2X7 receptor function [412, 413]. In the common laboratory mouse strains C57BL/6 and DBA/2, and in the lupus-prone NZB mice, an allelic variation (P451L) in the C-terminal tail of P2X7 confers a reduced sensitivity to extracellular ATP (eATP)-induced pore formation compared with BALB/c or NZW mice [414, 415]. Moreover, P2X7 splice variants with distinct functional properties could explain cell-type-dependent diversity of P2X7 function. For instance, the mouse P2X7k variant, which utilizes an alternative exon 1 encoding the N-terminus and first transmembrane domain, is activated by lower eATP concentrations than the P2X7a variant and shows faster kinetics of pore formation and membrane blebbing. Interestingly, a and k variants can form P2X7a/k heteromers in addition to P2X7a/a and

P2X7k/k homomers [413, 416]. T cells from P2X7a deficient mice display higher sensitivity to eATP than their wild-type counterpart, suggesting that P2X7k homomers are more responsive to eATP than P2X7a/k heteromers [417]. Interestingly, we have reported that the sensitivity to ATP of CD4 and CD8 T cells from C57BL/6 mouse depends more on their stage of activation and differentiation than on the levels of P2X7 membrane expression [418, 419], suggesting that the P451L allelic variant or the co-expression of P2X7a and P2X7k receptors cannot fully account for the variations in eATP sensitivity observed among the various CD4⁺ or CD8⁺ T-cell subsets.

CD4⁺ and CD8⁺ T cells have diverse lipid metabolism depending on their stage of activation and differentiation. In particular, cholesterol homeostasis plays a key role in regulating T-cell functions. Lipid rafts, which are microdomains enriched with cholesterol and sphingophospholipids, support T-cell activation by modifying raft-dependent signaling. When cholesterol recycling is impaired following apolipoprotein E deficiency, cholesterol accumulates in the plasma membrane of antigen-presenting dendritic cells enhancing antigen presentation and therefore the priming of naïve T cells [420]. Hypercholesterolemia also increases the expression of Foxp3 transcription factor and therefore the numbers of CD4⁺ regulatory T cells [421]. Membrane cholesterol plays a critical role in regulating the activity of P2X7, which contains several cholesterol recognition amino acid consensus motifs within its N-terminal and proximal C-terminal regions. The association of P2X7 with cholesterol-enriched microdomains / lipid rafts of the plasma membrane had been reported in different cell types. The trafficking of P2X7 into lipid rafts seems require caveolin-1 interaction or palmitoylation, depending on the cell type [422, 423]. Palmitoylation of the cytoplasmic cysteine-rich region at the end of the second transmembrane domain is also involved in the lack of desensitization of P2X7 after eATP binding [356] and pore formation [424]. Moreover, phosphatidylglycerol and sphingomyelin were found to facilitate P2X7 pore formation [424].

In contrast, membrane cholesterol negatively regulates P2X7-mediated pore formation and cell death [425] most probably to avoid excessive activation. The impact of membrane cholesterol content on eATP-induced cellular functions had been extensively evaluated in P2X7-transfected fibroblast or HEK 293 cells although noticeably less in T cells. Like cholesterol, gangliosides GM1 are concentrated in lipid rafts. GM1 have an active role in the formation, stabilization, and dynamics of lipid microdomains and as such have an important role in various immune functions, in particular, during antigen presentation by B cells and dendritic cells and the suppression of the proliferation of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells by regulatory T cells [426]. Thus, GM1 deficiency in effector T cells of the NOD mouse correlated with susceptibility to type 1 diabetes [141]. However, the role of lipid in P2X7 signaling remained poorly studied in T cells. To gain insight into the role of membrane cholesterol and ganglioside GM1 in the sensitivity to eATP of T cells expressing basal P2X7 levels, we have selected herein, among a panel of mouse leukemic T-cell lines, two different T-cell lines (EL4 and L1210) for their similar high levels of P2X7 membrane expression but opposite ability to trigger channel opening, pore formation and phosphatidylserine exposure upon ATP stimulation. Plasma membrane of eATP-lowly sensitive L1210 T cells contained significantly higher levels of cholesterol and lipid raft-resident GM1 gangliosides than eATP-highly sensitive EL4 T cells. Importantly, EL4 cells became resistant to eATP stimulation when their membrane cholesterol content was increased using Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD), whereas L1210 cells were rendered sensitive to eATP stimulation by decreasing their membrane cholesterol content. In MBCD/cholesterol-treated EL4 and untreated L1210 T cells, but not MBCD-treated L1210 or untreated EL4 T cells, P2X7 was found to mainly localize within lipid rafts. In the present study, we therefore establish a direct link between the sensitivity of T cells to eATP and the localization of P2X7 within or outside cholesterol-enriched microdomains / lipid rafts in

response to membrane cholesterol content modification, which is observed in normal CD4⁺ and CD8⁺ T cells upon antigenic activation and effector/memory differentiation.

Materials and Methods

Reagents

ATP⁴⁻ (Adenosine-5'-Triphosphate), P2X7 receptor antagonist A438079, Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD), FITC-conjugated Cholera toxin B subunit (CTB), Filipin III from *Streptomyces filipinensis*, Cholesterol ($\geq 99\%$), Cholesterol oxidase enzyme, Horseradish peroxidase (HRP), 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid (HPPA), Bovine serum albumin (BSA), Vanadium(V) oxide ($\geq 98\%$) and hydrogen peroxide were all purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO). YO-PRO-3, Fluo-4 AM and INDO-1-AM fluorescent probes (Molecular Probes), Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Phospho-ERK1/2 (Thr202, Tyr204) monoclonal antibody (clone MILAN8R, eBioscience), HRP-conjugated goat anti-mouse IgG Fc (A16084) antibody, as well as 4–12% precast polyacrylamide gel (Invitrogen NuPAGE Bis-Tris protein gels) and ECL Western Blotting Substrate (Pierce) were purchased from Thermo Fisher Scientific. HRP-conjugated donkey F(ab')₂ fragment anti-rabbit IgG (NA9340) antibody were from GE Healthcare.

Cell culture

EL4 (ATCC TIB-39) and L1210 (ATCC CCL-219) leukemic mouse T cells were purchased from ATCC and grown in RPMI 1640 Medium with GlutaMAX and 25 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum (FCS) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

mRNA expression analysis of P2X7a and P2X7k variants

Total RNA from EL4 and L1210 T-cell lines was extracted using RNeasy Kit (Qiagen), and 1 µg of each sample was reverse-transcribed into cDNA using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher). PCR were performed on cDNA using the FastStart High Fidelity PCR System (Merck), and primer sets specific for the P2X7a or P2X7k variant (supplementary Fig. 1). PCR products were gel-purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and nucleotide sequences were determined at Eurofin Genomics sequencing service (Ebersberg, Germany).

Flow cytometry phenotyping assay

EL4 and L1210 cells were phenotyped by flow cytometry using anti-CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12) and anti-CD45RABC/B220 (clone RA3-6B2) fluorescent-conjugated monoclonal antibodies (mAb). Fluorescent-conjugated rat IgG2a and IgG2b or Armenian hamster IgG mAbs were used as control isotype (eBioscience). P2X7 was detected using a rabbit polyclonal anti-P2X7 serum described previously [1, 418, 419]. Plasma membrane cholesterol was quantified by Filipin III staining. Binding of FITC-labelled CTB allowed to quantify ganglioside GM1 and to identify lipid rafts. Data acquisition was performed at flow cytometry core facility PLAIMMO-IPSIT, Université Paris Saclay, INSERM, CNRS (Clamart, France). Flow cytometry data were analysed using FlowJo (Treestar, Ashland, OR) software.

Cholesterol modulation treatment

To increase or reduce plasma membrane cholesterol content, EL4 and L1210 cells were treated with RPMI 1640 medium containing MBCD/Cholesterol complexes at 12:1 molar ratio for 2 h at 37°C or 5 mM MBCD and 2% BSA for 20 min at 37°C, respectively. MBCD was subsequently removed after washing cells extensively with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) Solution (Gibco, Thermo Fisher Scientific). In some experiments, basal cholesterol

levels were restored in cholesterol-depleted or -loaded cells by MBCD or MBCD/Cholesterol treatment as described above.

Measurement of plasma membrane cholesterol levels

Cholesterol oxidase-based assay was used to quantify plasma membrane cholesterol content in EL4 and L1210 cells frozen in FCS-free PBS medium (-20°C). Hydrogen peroxide H_2O_2 generated by cholesterol oxidase-induced free cholesterol oxidation was quantified through the enzymatic conversion of HPPA substrate to fluorescent di-HPPA by HRP. Briefly, $50\ \mu\text{l}$ of cell suspension (10^7 cells/ml) were treated with 0.05 U cholesterol oxidase, 0.1 U HRP and 2 mM HPPA in PBS containing 0.1 % Triton X-100 for 60 min at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Fluorescence measurement (excitation wavelength 320 nm, emission wavelength 404 nm) was performed using Infinite M200 PRO microplate reader (TECAN, Switzerland). The relationship between di-HPPA fluorescence and cholesterol concentration is determined using a standard curve prepared by serial log₂ dilutions of 1 mM cholesterol stock solution.

Proteolysis of B220 by trypsin and pervanadate inhibition of tyrosine phosphatase activity

Transmembrane tyrosine phosphatase B220/CD45RABC is highly expressed on L1210 T cells, but not EL4 cells. B220-negative L1210 cells were generated by treating 5×10^5 cellules/ml with 0.05% trypsin solution (Gibco, Thermo Fisher Scientific) for 15 min at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. To irreversibly inactivate tyrosine-phosphatase activity, L1210 cells (10^6 cellules/ml) were treated with 0, 10, 20, 50 or 100 μM pervanadate (vanadate-hydrogen peroxide complex) for 5 to 20 min at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cell viability as well as B220 and CD90 membrane expression were determined by flow cytometry using propidium iodide, and anti-CD90 (clone 30-H12) and anti-CD45RABC/B220 (clone

RA3-6B2) fluorescent-conjugated mAb. Moreover, western blotting with anti-phospho-ERK1/2 primary antibodies and HRP-labelled secondary antibodies was used to confirm the inhibition of tyrosine-phosphatase activity in L1210 cells.

Protein quantification

To normalise membrane cholesterol content to protein levels, the amount of proteins in each sample was measured using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher scientific), according to the manufacturer instructions. Absorbance was determined at 562 nm using a Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies, Germany).

Cell surface protein biotinylation and DRM isolation

For cell surface protein enrichment, we used the EZ-Link Sulfo-NHS-LC kit, according to the manufacturer instructions (Thermo Fisher scientific). Cells were incubated with Sulfo-NHS-LC-Biotin at 4°C for 30 min, then resuspended in Tris-buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) containing 0.05% Triton X-100 and a cocktail of protease inhibitor (A32961, Pierce, Thermo Scientific), and passed 10 times through a 21G syringe needle diameter. Lysates were adjusted to 40% sucrose and placed on the bottom of a SW 41 ultracentrifugation tube (Beckman Coulter) and overlay with 6 ml of 36% and 3.5 ml of 5% sucrose solution. Sucrose density gradients were subsequently centrifuged at 38,000 rpm for 16 h at 4°C. Membrane domains were harvested by carefully collecting 6 fractions of 2 ml from the top of the gradient, DRMs float at the interphase of 36% and 5% sucrose solutions. All fractions were submitted to precipitation with neutravidin-beads at 4°C overnight and neutravidin-bound proteins were analysed by SDS-PAGE.

Analysis of P2X7-induced cellular function by flow cytometry

The levels of P2X7 cellular responses to ATP⁴⁻ stimulation was measured by flow cytometry as described previously [1, 418, 419]. Briefly, the EL4 and L1210 T-cell lines were treated by 500 μM ATP⁴⁻ for 30 min at 37°C. P2X7-induced pore formation was investigated by quantifying YO-PRO-3 fluorescent probe entry (molecular weight 655 Da) into EL4 and L1210 cells. Phosphatidylserine exposure was assayed using the Annexin V apoptosis detection kit (eBioscience). Calcium influx was quantified by real-time flow cytometry (CytoFLEX, Beckman Coulter). EL4 and L1210 cells were loaded with 3 μM calcium-reactive fluorescence probe Fluo-4 AM (Life Technologies) for 20 min at room temperature. Changes in mean fluorescence intensity (MFI) values of Fluo-4 AM were measured over time in response to ATP stimulation. In some experiments, cells were pre-treated with 10 μM of P2X7 competitive antagonist A438079 prior to ATP⁴⁻ stimulation. Data acquisition was performed at flow cytometry core facility at PLAIMMO-IPSIT (Université Paris-Saclay, INSERM, CNRS, Clamart, France) and I2BC (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Flow cytometry data were analysed using FlowJo software (Tree Star Inc).

Calcium influx measurement

P2X7 dependent calcium influx was live monitored using a ratiometric probe. EL4 and L1210 cells were loaded with 4 μM INDO-1-AM cell permeant calcium indicator (excitation wavelength 360 nm, emission wavelength 405 nm and 480 nm) in PBS for 1 h at room temperature with gentle agitation. Cells were resuspended in Ca²⁺-free HBS solution (Gibco, Thermo Fisher Scientific) and subsequently analysed using a spectrofluorometer with thermostating (37°C) and stirring capabilities (RF-1501 Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Cytosolic Ca²⁺ concentration was calculated according to the equation $[Ca^{2+}]_{cyt} = Kd * (R - Rmin) / (Rmax - R)$, where *Kd* is the dissociation constant of INDO-1-calcium complex (230 nM), and *R* is the ratio of fluorescence values recorded at 480 and 405 nm overtime. Maximum

(*Rmax*) and minimum (*Rmin*) INDO-1 fluorescence values recorded at 480 nm in the presence of 1 μ M ionomycin and 10 mM Ca^{2+} , or following depletion of external Ca^{2+} with 5 mM EGTA respectively.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical comparison between treatments and groups were made by Student's t-test. Degree of significance are presented as follows: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Results

Impaired P2X7 activity but not membrane expression in the L1210 T-cell line

P2X7 stimulation by eATP can induce various cellular responses such as channel opening, pore formation, PS exposure, ectodomain shedding and cell death. Previously, we have reported that the sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ mouse T cells to eATP depends more on their stage of activation and differentiation than on the levels of P2X7 membrane expression [418, 419]. Interestingly, it has been reported that some allelic (e.g. P451L) [414, 415] or splice (e.g. P2X7a and P2X7k) [413, 416, 417] variants can alter the sensitivity of mouse P2X7 to eATP. To gain further insights into the molecular mechanism underlying the sensitivity of T cells to eATP, we have selected the L1210 and EL4 CD90⁺ T-cell lines among several leukemic cell lines for their similar P2X7 membrane expression levels but opposite sensitivity to eATP stimulation (Fig. 1). Thus, although P2X7 was highly expressed on L1210 cells at an even higher level than EL4 cells (P2X7 MFI values 50 vs. 37, Fig 1B), L1210 cells were unable to expose PS (Annexin V staining), form pores (YO-PRO-3 uptake) and open calcium channels (calcium indicator, Fluo-4 AM) in the presence of 500 μ M eATP (Fig. 1C and 1D). In contrast, the stimulation of EL4 T cells with eATP promoted calcium entry from the extracellular space, PS externalization and pore formation. The SERCA pump inhibitor Thapsigargin was added after the stimulation with eATP to verify that T cells were efficiently loaded with Fluo-4 AM Ca²⁺ indicator (Fig. 1D). Moreover, the competitive P2X7 antagonist A438079 was added before the stimulation with eATP (+A438079) to confirm the involvement of P2X7 in eATP-induced calcium influx, pore formation and PS exposure in EL4 T cells (Fig. 1C and 1D). To determine whether L1210 cells are utterly unresponsive to eATP or require a higher dose of eATP to be activated, we conducted dose–response experiments with eATP ranging from 200–5000 μ M (Fig. 1E). Unexpectedly, while L1210 T cells were totally resistant to eATP-mediated PS exposure and cell death, at any dose tested (data not shown), they were able to form pores,

but with significantly higher amount of eATP than EL4 cells (Fig. 1E). Thus, while half-maximal effective concentration (EC_{50}) for pore formation was 2000 μ M eATP in L1210 cells, it was only 400 μ M eATP in EL4 cells (Fig. 1F).

The EL4 and L1210 T-cell lines were established from leukemia induced in B6 and DBA/2 mouse strain, respectively. Importantly, both mouse strains carry the less responsive allele of P2X7, the L451 variant, suggesting that the P451L allelic variation cannot account for the difference in eATP sensitivity observed between EL4 and L1210 cells. Therefore, we compared the *p2rx7* allele carried by EL4 and L1210 T cells by sequencing PCR products amplified from EL4 and L1210 cDNA using primers specific to the *p2rx7* sequence (supplementary Fig 1). Sequence analysis confirmed that EL4 and L1210 cells carried the L451 variant. Moreover, EL4 and L1210 cells contained both P2X7a and P2X7k mRNA splice variant. To conclude, the differences in the levels of P2X7 signaling found between EL4 and L1210 cells cannot be explained by already known allelic variation or splice variant.

B220 membrane expression, tyrosine phosphatase activity and impaired P2X7 activity

B220 is the full-length splicing isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45 expressed on T cells before undergoing apoptosis [427]. Previously, we have reported that the expression of B220 / CD45RABC strictly correlated with an impaired ability of T cells to expose PS or form pore following stimulation by eATP [1]. Interestingly, L1210 T cells, but not EL4 T cells constitutively expressed B220 molecules at the plasma membrane (Fig. 1A). CD45 molecules, especially B220, are characterized by a very large extracellular domain [427], which could have indirect effects on P2X7 through steric hindrance. Therefore, L1210 cells have been subjected to mild trypsinization (0.05%) or to pervanadate treatment to evaluate whether the extracellular or intracellular domain of B220 determine their resistance to eATP (supplementary Fig. 2). Trypsin concentration and duration of the treatment

did not alter the viability of L1210 cell and allow the rapid digestion of the extracellular domain of B220 (supplementary Fig. 2A), but not of CD90 (MFI values: control 1381 vs. trypsinized 1578) and P2X7 as evidenced by the high levels of eATP-mediated pore formation and PS exposure in trypsinized EL4 cells. Importantly, trypsin-treated L1210 cells remained unable to form P2X7 pores in the presence of 500 μ M eATP (supplementary Fig. 2B).

The P2X7/ATP pathway can induce ERK 1/2 phosphorylation. However, pERK 1/2 is poorly detected in L1210 cells even in the presence of PMA or PDBu (supplementary Fig. 2C), suggesting that L1210 cells exhibited elevated tyrosine phosphatase activities that could be mediated at least in part by B220. Interestingly, treatment of L1210 cells with the pervanadate phosphatase inhibitor markedly increases cellular pERK 1/2 levels in a concentration- and time-dependent manner (supplementary Fig. 2C and data not shown). However, pervanadate-treated L1210 cells remained unable to form pores in the presence of 500 μ M ATP (supplementary Fig. 2D).

Taken together, our data indicate that neither the extracellular domain of B220 nor its intracellular phosphatase domain were involved in the reduce ability of L1210 cells to respond to eATP stimulation.

Membrane cholesterol levels and impaired P2X7 activity

A variety of receptors are regulated by changes in the level of membrane cholesterol and partition into cholesterol-enriched membrane domains. Thus, depending on the receptor type, the increased membrane cholesterol levels lead to either the inhibition or the potentiation of receptor activity. Therefore, we have quantified membrane (free) cholesterol levels in L1210 and EL4 cells using enzymatic assay and fluorescent Filipin III-staining (Fig. 2A). Interestingly, free cholesterol concentration was significantly higher in L1210 than EL4 whole cell lysates (5.84 μ g/mg vs. 3.55 μ g/mg protein). Likewise, Filipin III-staining of living cells

confirmed the higher cholesterol content in L1210 than in EL4 plasma membrane (MFI values 7×10^4 vs. 1.5×10^4 , Fig. 2A). Moreover, since gangliosides GM1 are specifically found in cholesterol-enriched membrane domains and play a major role in receptor signaling, we have quantified GM1 levels in L1210 and EL4 plasma membrane using FITC-conjugated CTB (Fig. 2B). Importantly, L1210 cells expressed GM1 at significantly higher levels than EL4 cells (CTB MFI values 4792 vs. 2249). Taken together, our data show that L1210 plasma membrane displays high levels of cholesterol and GM1, suggesting a lipid raft enrichment in L1210 cells compared to EL4 cells. Previously, we had reported that the cell surface expression of P2X7 is dependent on its localization into lipid raft [422]. Therefore, we have analyzed the partition of P2X7 within DRM and non-DRM fractions of L1210 and EL4 plasma membrane isolated by sucrose density gradient ultracentrifugation after biotinylation of cell surface proteins. While P2X7 was found in both DRM and non-DRM fractions from L1210 and EL4 plasma membrane, the DRM pool of P2X7 appeared markedly more important in L1210 than in EL4 cells (Fig. 2C). Moreover, whole protein quantification in DRM and non-DRM fractions revealed a 2-fold increase of protein content in DRM fractions from L1210 cells compared to their non-DRM counterpart. In contrast, similar levels of whole proteins were found within DRM and non-DRM fractions of EL4 cells (Fig. 2D). Taken together, our data suggest that the reduced sensitivity to eATP of P2X7 in L1210 cells might result from its preferential localization within lipid raft due to their enrichment in L1210 cells.

Membrane cholesterol modulation affected P2X7 localization and eATP sensitivity

To confirm our hypothesis on the influence of lipid raft on P2X7 sensitivity to eATP, we used MBCD and MBCD loaded with cholesterol (MBCD/Chol) to decrease or to increase membrane cholesterol levels in EL4 and L1210 cells, leading to either the disruption or the aggregation of lipid raft. Importantly, MBCD treatment markedly reduced membrane

cholesterol content of L1210 cells without impacting cell viability as shown by the ability of L1210 cells to regulate their calcium intracellular concentration following MBCD treatment (Fig. 3A, and data not shown). Moreover, the basal membrane cholesterol levels in MBCD-treated L1210 cells have been restored using MBCD/Chol complexes (Fig. 3A). In EL4 cells, we have also been able to both significantly increase membrane cholesterol levels, and subsequently restore its initial level (Fig. 3B). Importantly, in MBCD/Chol-treated EL4 cells, the levels of membrane cholesterol reached those of untreated L1210 cells (Fig. 3 A and B). Moreover, the partition of whole proteins between DRM and non-DRM in EL4 and L1210 cells was markedly affected by MBCD and MBCD/Chol complexes treatment in agreement with their capacity to disrupt or aggregate lipid rafts (Fig. 3C). Accordingly, the partition of P2X7 between DRM and non-DRM and more importantly its sensitivity to eATP were also modified by these treatments (Fig. 3D and Fig. 4). Indeed, cholesterol depletion of L1210 plasma membrane decreased the proportion of P2X7 within lipid raft (Fig. 3D) associated with a significant increase in eATP-induced channel opening and pore formation (Fig. 4A). In EL4 cells, cholesterol enrichment increased the proportion of P2X7 within lipid raft (Fig. 3D), and significantly decrease eATP-induced channel opening and pore formation (Fig. 4B). Interestingly, the restoration of basal cholesterol levels in EL4 cells allowed a total recovery of pore formation capacity in the presence of eATP, but only a partial rescue of channel opening (Fig. 4B). Taken together, these data confirm that the reduced sensitivity of L1210 cells to eATP resulted from the main localization of P2X7 within cholesterol-enriched microdomains.

Discussion

Previously, we have reported that the sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to eATP depends more on their stage of activation and differentiation than on P2X7 membrane expression levels [418, 419]. Although various studies reported that membrane cholesterol levels fluctuate during T-cell differentiation, the impact of membrane cholesterol content on eATP-induced cellular functions had been poorly evaluated in T cells. Previously, we have reported that P2X7 membrane expression required palmitoylation of the cytoplasmic cysteine-rich region at the end of the second transmembrane domain. Importantly, the palmitoylation of P2X7 leads to its localization within lipid raft, whereas depalmitoylation of P2X7 allows its relocalisation outside lipid rafts [422]. Our data suggest that P2X7 exist at the plasma membrane as two distinct pools in agreement with data obtained in rat submandibular gland showing that the P2X7 pools localized within and outside lipid raft displayed different eATP-induced cellular functions [354]. Lipid rafts are microdomains enriched with cholesterol and sphingophospholipids, and gangliosides GM1. It remains to determine the respective involvement of each of this lipid in the sensitivity of T cells to eATP. Indeed, it has been reported that P2X7-mediated pore formation were facilitated by membrane phosphatidylglycerol and sphingomyelin [424], but negatively regulated by membrane cholesterol [424, 425]. Although important, we consider that these data on the role of cholesterol on P2X7 sensitivity to eATP cannot be fully extended to T cells since they had been performed in proteoliposomes [424] or in P2X7-transfected HEK or HeLa cells [425]. The ability of P2X7 isoform to sustain calcium influx overtime and to induce pore formation, CD62L shedding, PS exposure and cell death is due to its key characteristic, the inability to desensitize in the presence of eATP. Importantly, cryo-electromicroscopy analysis of P2X7 structure revealed that palmitoylation is responsible for this non-desensitization [356]. As we shown previously [422], palmitoylated P2X7 are localized within lipid rafts. Therefore, these reports suggest that eATP-induced cellular functions should only occur when P2X7 is

palmitoylated and sequestered within cholesterol-enriched microdomains/lipid rafts. However, this suggestion could be in contradiction with Garcia-Marcos et al. [354], which has shown that eATP-induced calcium influx exclusively occurred through the pool of P2X7 localized outside lipid rafts as well as with Karasawa et al. [424], showing negative influence of the levels of membrane cholesterol on the ability of P2X7 to induce pore formation and canal opening. Like cholesterol, gangliosides GM1 are concentrated in lipid rafts and have an active role in the formation, stabilization, and dynamics of lipid microdomains [426] as well as on receptor signaling [138]. However, to our best knowledge, the role of GM1 in P2X7 signaling had not been studied in T cells.

To gain insight into the role of membrane cholesterol in the sensitivity to eATP of T cells, we have selected, the mouse EL4 and L1210 leukemic T-cell lines for their similar high levels of P2X7 membrane expression, but opposite ability to trigger channel opening, pore formation and phosphatidylserine exposure upon eATP stimulation. Interestingly, we found that plasma membrane of eATP-resistant L1210 cells contained significantly higher levels of cholesterol and lipid raft-resident GM1 gangliosides than eATP-highly sensitive EL4 cells. Importantly, while EL4 cells became resistant to eATP stimulation when their membrane cholesterol content was increased using MBCD/cholesterol complex, eATP-resistant L1210 cells were rendered sensitive to eATP stimulation by decreasing their membrane cholesterol content using MBCD. Interestingly, the restoration of basal membrane cholesterol levels in EL4 cells led to a total return of pore formation capacity, but only a partial return of channel opening in response to eATP. In all experiments, the P2X7 specific inhibitor A438079 has been used to ascertain that the differences in P2X7-induced cellular functions in T cells observed following cholesterol plasma membrane modulation were not influenced by other purinergic receptor. Although the global levels of membrane GM1 remained unchanged during MBCD treatment associated or not with cholesterol, we cannot exclude that these treatments impact GM1 partition at the

plasma membrane in agreement with the ability of MBCD to disrupt lipid rafts. Therefore, we cannot conclude about the role of GM1 on the sensitivity of T cells to the P2X7/eATP pathway. To control the integrity of the plasma membrane of L1210 and EL4 T cells following MBCD treatment, we have analysed calcium influx during MBCD treatment by real-time spectrofluorometry and flow cytometry. Satisfyingly, size (FSC) and granularity (SSC) of L1210 and EL4 cells were characteristic of living T cells ($FSC^{high}SSC^{low}$), and they remained able to control their calcium homeostasis. In addition to MBCD treatment, basal cholesterol levels have been reduced by cultivating L1210 and EL4 cells in RPMI medium supplemented with either delipidated serum or normal serum containing statin. Although this treatment reduced significantly the ability of T cells to proliferate, they displayed a significant reduction in membrane cholesterol levels along with increase ability to form pore in the presence of eATP in agreement with data obtain during MBCD treatment (Figure 3S). Finally, P2X7 partition in L1210 and EL4 plasma membrane, in conjunction with the sensitivity of P2X7 to eATP, was analysed using sucrose density gradient ultracentrifugation, and western blotting. Thus, we found a higher proportion of P2X7 within lipid raft in L1210 than EL4 T cells. However, we have not be able to quantify the precise amount of P2X7 within and outside lipid rafts since non-DRM fraction contained both non lipid rafts membrane proteins and cytosolic proteins. This goal had been achieved by performing cell surface biotinylation and biotinylated proteins purification using agarose neutravidin beads to eliminate cytosolic protein content. This additional step confirmed more precisely our previous findings about the different membrane partition of P2X7 between L1210 and EL4 T cells. Moreover, we observed that in MBCD/cholesterol-treated EL4 and untreated L1210 cells, but not MBCD-treated L1210 or untreated EL4 cells, P2X7 were found to mainly localize within lipid rafts and displayed similar low sensitivity to eATP. These data are in agreement with the increase of the levels of plasma membrane cholesterol and the proportion of total membrane protein found within lipid rafts.

Interestingly, the consecutive treatment by MBCD/Chol and then MBCD in EL4 cells failed to fully restore the initial proportion of P2X7 located outside lipids rafts, which can explain the only partial return of channel opening in response to eATP observed in functional assay. Unexpectedly, L1210 cells seemed to be affected to a lesser extent than EL4 cells by successive cholesterol depletion and restoration regarding P2X7 relocalization, suggesting that P2X7 partition at the plasma membrane is only partially involved on its sensitivity to eATP in L1210 cells.

Although the modulation of plasma membrane cholesterol levels with MBCD allowed a significant increase of L1210 cells P2X7 sensitivity, this treatment well known to disrupt lipid rafts only led to a limited relocalization of P2X7 receptor outside lipid rafts. Therefore, the present study establishes a direct link between the sensitivity of T cells to eATP and their membrane cholesterol content, while P2X7 membrane localisation seem to play a lesser role in the regulation of eATP-induced cellular functions in T cells.

Figures Legends

Figure 1: Sensitivity of EL4 and L1210 T-cell lines to eATP stimulation. **A)** CD90 and B220 membrane expression levels were measured by flow cytometry using anti-CD90 and anti-B220 fluorescent mAb. **B)** P2X7 membrane expression was quantified by flow cytometry using a rabbit polyclonal anti-P2X7 serum and secondary FITC-conjugated anti-rabbit IgG. **C)** Non selective pore formation (YO-PRO-3 uptake) and PS externalisation (Annexin V labelling) were assessed by flow cytometry following stimulation with 500 μ M eATP at 37°C for 30 min. **D)** ATP-induced calcium influx was measured by real-time flow cytometry using Fluo-4 AM calcium probe. Thapsigargin (Tg) was used to confirm calcium probe internalization. **E)** Dose–response experiments (200 to 5000 μ M) for eATP-induced pore formation, PS externalisation and cell death in EL4 and L1210 cells. **F)** EC₅₀ assay for pore formation in EL4 and L1210 cell lines. In some experiments, EL4 and L1210 cells were pre-treated with 10 μ M P2X7 antagonist A438079.

Figure 2: Free cholesterol and lipid raft levels as well as P2X7 membrane partition in EL4 and L1210 cell lines. **A)** Non-esterified cholesterol was measured using enzymatic assay based on di-HPPA fluorescence (left histograms) and Filipin III staining (middle panel). **B)** Lipid rafts were quantified by gangliosides GM1 staining using FITC-conjugated CTB. **C, D)** P2X7, Flotilin, and TfR (CD71) partition was analyzed by western blot following 36% / 5% sucrose density gradient ultracentrifugation of whole cell lysate (**C**) and biotin-labeled cell surface proteins (**D**) extracted from EL4 or L1210 cells using 0.05% Triton X-100 at 4°C. Total protein amount was quantified using BCA protein assay kit, and presented as protein concentration within each fraction (**C**) and as the ratio of protein concentration between non-DRM and DRM fractions (**D**). Data on plasma membrane cholesterol content were expressed as mean

percentages \pm SEM (n = 4 individual experiment). Asterisks denote statistically significant differences between indicated groups. $**P \leq 0.005$.

Figure 3: Plasma membrane cholesterol modulation by MBCD loaded or not with cholesterol. **A, B)** Non esterified cholesterol was measured using enzymatic assay based on di-HPPA fluorescence. L1210 and EL4 cells were either left untreated or were depleted or enriched in cholesterol by MBCD (**A**) or MBCD/Chol treatment (**B**), respectively. In some experiments, basal cholesterol levels were restored by MBCD/Chol (**A**) or MBCD (**B**) treatment. The viability of L1210 cells was controlled by treating cells with MBCD during live calcium measurement without any stimulation (**A**, right panel). **C)** The amount of total membrane protein was quantified using BCA protein assay kit, and presented as the ratio of protein concentration between non-DRM and DRM fractions. **D)** P2X7, Flotilin, and TfR (CD71) partition was analyzed by western blot following 36% / 5% sucrose density gradient ultracentrifugation of biotin-labeled cell surface proteins extracted from untreated, MBCD- or MBCD/Chol-treated EL4 or L1210 cells using 0.05% Triton X-100 at 4°C. ImageJ software was used for ROI analysis of P2X7 partition. Membrane cholesterol content is expressed as mean percentages \pm SEM (n = 4 individual experiment). Asterisks denote statistically significant differences between indicated groups. $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.005$.

Figure 4: Effect of plasma membrane cholesterol modulation on the sensitivity of EL4 and L1210 cells to eATP/P2X7 pathway. L1210 and EL4 cells were either left untreated or were depleted or enriched in cholesterol by MBCD (**A**) or MBCD/Chol treatment (**B**), respectively. In some experiments, basal cholesterol levels were restored by MBCD treatment (**B**). Calcium influx was quantified using INDO-1 ratiometric probe. Pore formation was evaluated by quantifying YO-PRO-3 uptake by flow cytometry. ATP-induced YO-PRO-3-uptake

histograms of untreated L1210 cells (black histogram) are overlaid on YO-PRO-3 uptake histograms of MBCD (red histogram) and MBCD + MBCD/Chol (grey histogram) treated L1210 cells. P2X7-induced pore formation are expressed as mean percentages \pm SEM (n = 4 individual experiment). Asterisks denote statistically significant differences between indicated groups. *P \leq 0.05; **P \leq 0.005.

Supplementary Figure

Supplementary Figure 1: P2X7a and P2X7k splicing variants. A) Schematic representation of the transmembrane domain 1 and 2 (TM1 and TM2), and extracellular and cytoplasmic domain of P2X7. The structure and length of the P2X7a and P2X7k exons is schematized along with the start or stop codons. Arrows indicate the position of forward and reverse primers used to amplify and sequence P2X7a and P2X7k cDNA variants. B) The table shows the nucleotide sequence of forward and reverse PCR primers used for the amplification and the sequencing of the various exons of P2X7a and P2X7k variants.

Supplementary Figure 2: Trypsin and Pervanadate treatment of B220⁺ L1210 cells. A) L1210 and EL4 cells were either left untreated or treated by 0.05% trypsin solution for 15 min at 37°C. L1210 cells were subsequently stained with fluorescent anti-B220 mAb and Propidium iodide (PI) to assay B220 expression (A, left panel) and cell survival (A, right panel) by flow cytometry. B) P2X7-induced pore formation (YO-PRO-3 uptake) and PS externalisation (Ann V staining) were assayed in L1210 and EL4 cells by flow cytometry following trypsin treatment and 500 μ M eATP stimulation. In some experiments, L1210 cells were pre-treated with 10 μ M P2X7 antagonist A438079. Histogram shows P2X7-induced pore formation expressed as mean ratio of ATP-stimulated and unstimulated L1210 cells \pm SEM (n= 3 individual experiment). C, D) L1210 and EL4 cells were treated by 100 μ M pervanadate for 0, 10 or 20 min. Cell lysates

were analyzed by Western blot for the phosphorylation of kinase ERK1/2 using anti-pERK1/2 (Thr202,Tyr204) mAb (C, left panel). Positive control consisted of L1210 and EL4 cells treated by PDBu to induced ERK1/2 phosphorylation (C, right panel). D) Pervanadate pre-treated L1210 and EL4 were stimulated with eATP and P2X7-induced pore formation (YO-PRO-3 uptake) was measured by flow cytometry. In some experiments, L1210 and EL4 cells were pre-treated with 10 μ M P2X7 antagonist A438079. Asterisks denote statistically significant differences between indicated groups. *P \leq 0.05

Supplementary Figure 3: reduction of exogenous cholesterol imports and endogenous cholesterol synthesis. EL4 and L1210 cells were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with either lipid free FCS (A) or normal FCS + 10 μ M simvastatin (B). Free cholesterol levels were quantified by enzymatic assay. eATP-induced pore formation (YO-PRO-3 uptake) was evaluated by flow cytometry using fluorescent. The specificity of the P2X7 stimulation was assessed using A438079 P2X7 inhibitor. Asterisks denote statistically significant differences between indicated groups. *P \leq 0.05; **P \leq 0.005; ***P \leq 0.001.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Wadih Gattas, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux, Orsay, France, from providing Infinite M200 PRO microplate reader. The authors would also thank Drs. Natalie Fournier and Hani Dakroub, Unité interdisciplinaire Lip(Sys)² for their technical expertise in cholesterol preparation.

References

1. Giuliani AL, Sarti AC, Falzoni S, Di Virgilio F. The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Frontiers in pharmacology* 2017;8:123.
2. Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, et al. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Molecular biology of the cell* 2009;20(6):1785-94.
3. Kopp R, Krautloher A, Ramirez-Fernandez A, Nicke A. P2X7 Interactions and Signaling - Making Head or Tail of It. *Frontiers in molecular neuroscience* 2019;12:183.
4. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of immunology* 2002;168(12):6436-45.
5. Witting A, Chen L, Cudaback E, Straiker A, Walter L, Rickman B, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(16):6362-7.
6. Chen L, Brosnan CF. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *Journal of immunology* 2006;176(5):3115-26.
7. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature communications* 2012;3:1034.
8. Faliti CE, Gualtierotti R, Rottoli E, Gerosa M, Perruzza L, Romagnani A, et al. P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* 2019;216(2):317-36.

9. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2008;455(7214):808-12.
10. Schenk U, Frascoli M, Proietti M, Geffers R, Traggiai E, Buer J, et al. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Science signaling* 2011;4(162):ra12.
11. Purvis HA, Anderson AE, Young DA, Isaacs JD, Hilkens CM. A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *Journal of immunology* 2014;193(3):1142-50.
12. Li M, Yang C, Wang Y, Song W, Jia L, Peng X, et al. The Expression of P2X7 Receptor on Th1, Th17, and Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus or Rheumatoid Arthritis and Its Correlations with Active Disease. *Journal of immunology* 2020;205(7):1752-62.
13. Fuller SJ, Stokes L, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS. Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic signalling* 2009;5(2):257-62.
14. Xu XJ, Boumechache M, Robinson LE, Marschall V, Gorecki DC, Masin M, et al. Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *Journal of cell science* 2012;125(Pt 16):3776-89.
15. Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, Haag F. Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *Journal of immunology* 2002;169(8):4108-12.
16. Elliott JI, McVey JH, Higgins CF. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis research & therapy* 2005;7(3):R468-75.
17. 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. *The Journal of biological chemistry* 2009;284(38):25813-22.

18. Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Sojka DK, Richardson JC, Sheardown SA, Harrison SM, et al. Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses. *Journal of leukocyte biology* 2009;85(6):978-86.

19. Safya H, Mellouk A, Legrand J, Le Gall SM, Benbijja M, Kanellopoulos-Langevin C, et al. Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage. *Frontiers in immunology* 2018;9:360.

20. Mellouk A, Bobé P. CD8(+), but not CD4(+) effector/memory T cells, express the CD44(high)CD45RB(high) phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses. *FASEB journal* 2019;33(3):3225-36.

21. Bonacina F, Coe D, Wang G, Longhi MP, Baragetti A, Moregola A, et al. Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nature communications* 2018;9(1):3083.

22. Mailer RKW, Gistera A, Polyzos KA, Ketelhuth DFJ, Hansson GK. Hypercholesterolemia Enhances T Cell Receptor Signaling and Increases the Regulatory T Cell Population. *Scientific reports* 2017;7(1):15655.

23. Gonnord P, Delarasse C, Auger R, Benihoud K, Prigent M, Cuif MH, et al. 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* 2009;23(3):795-805.

24. Murrell-Lagnado RD. Chapter Eight - Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol. In: Levitan I, editor. *Current Topics in Membranes*: Academic Press; 2017. p. 211-32.

25. McCarthy AE, Yoshioka C, Mansoor SE. Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell* 2019;179(3):659-70 e13.
26. Karasawa A, Michalski K, Mikhelzon P, Kawate T. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *eLife* 2017;6.
27. Robinson LE, Shridar M, Smith P, Murrell-Lagnado RD. Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *The Journal of biological chemistry* 2014;289(46):31983-94.
28. Ledeen RW, Wu G. The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. *Trends in biochemical sciences* 2015;40(7):407-18.
29. Wu G, Lu ZH, Gabius HJ, Ledeen RW, Bleich D. Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression. *Diabetes* 2011;60(9):2341-9.
30. Le Gall SM, Legrand J, Benbijja M, Safya H, Benihoud K, Kanellopoulos JM, et al. Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PloS one* 2012;7(12):e52161.
31. Hermiston ML, Zikherman J, Zhu JW. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunological reviews* 2009;228(1):288-311.
32. Garcia-Marcos M, Perez-Andres E, Tandel S, Fontanils U, Kumps A, Kabre E, et al. Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *J Lipid Res* 2006;47(4):705-14.
33. Sarmiento MJ, Ricardo JC, Amaro M, Sachl R. Organization of gangliosides into membrane nanodomains. *FEBS Lett* 2020;594(22):3668-97.

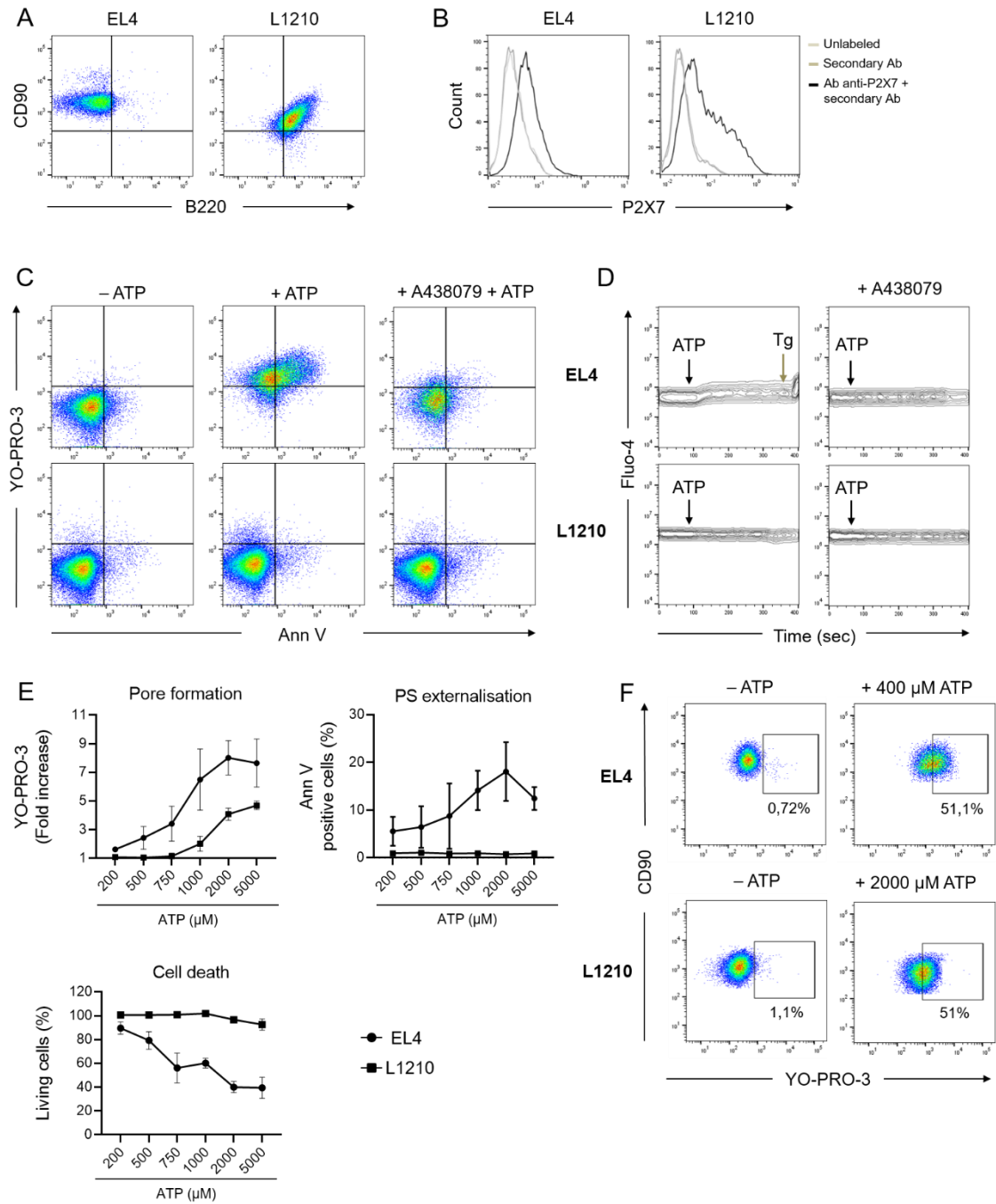


Figure 1

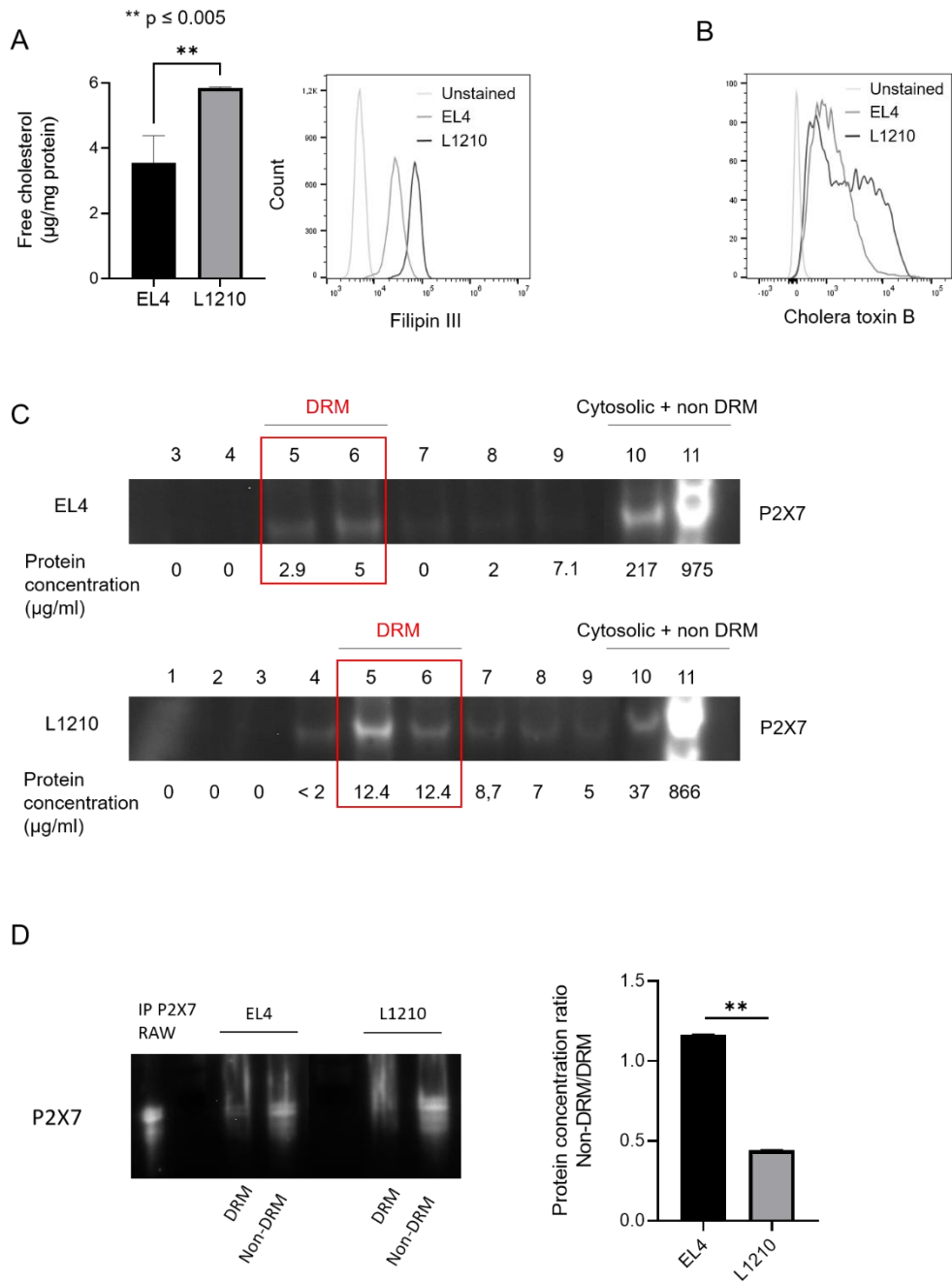


Figure 2

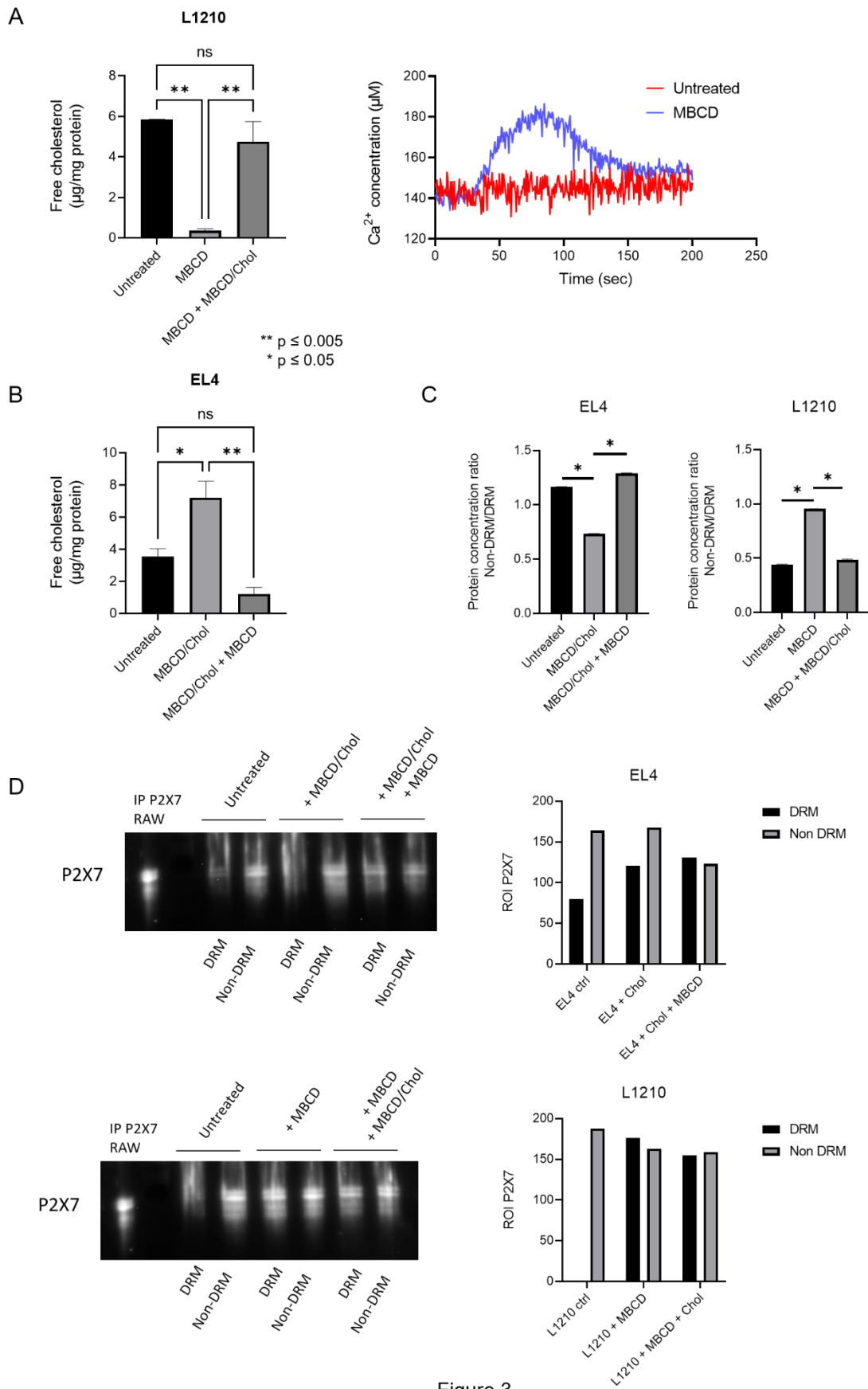
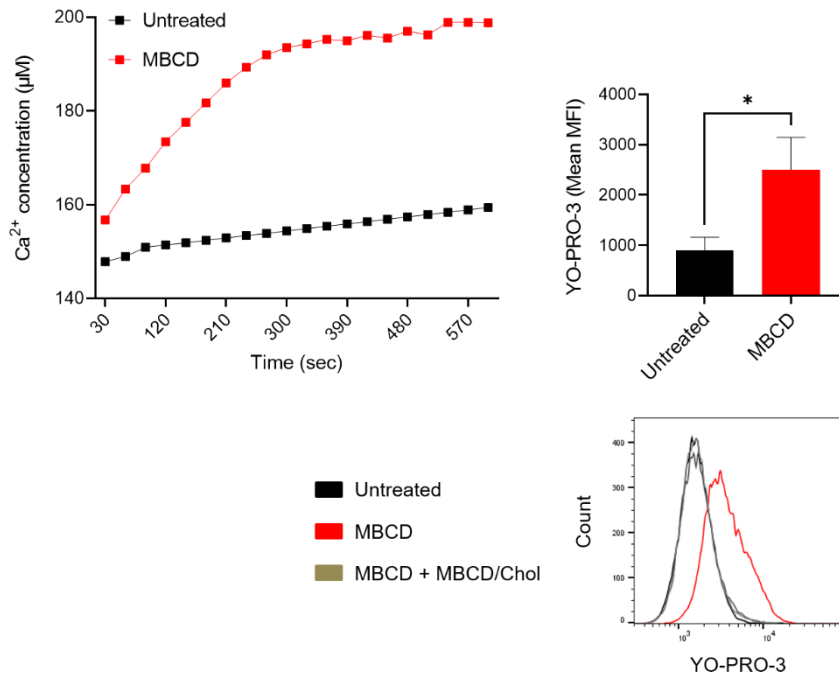


Figure 3

A

L1210



B

EL4

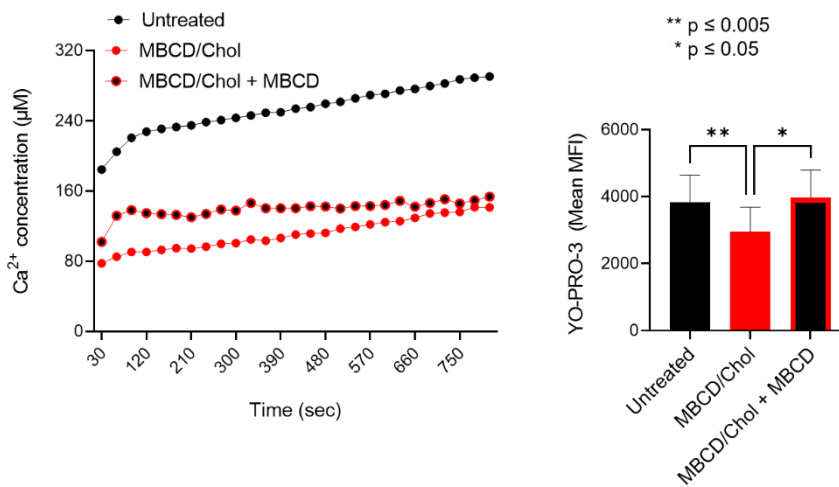
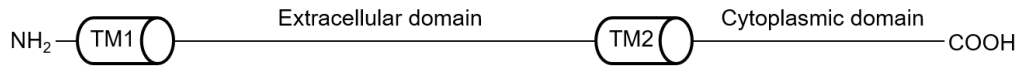
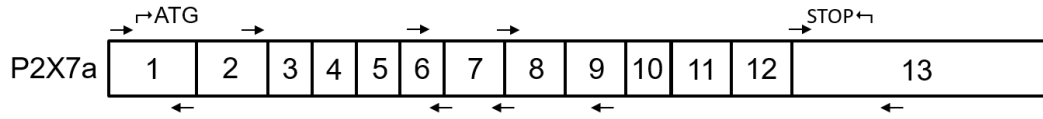


Figure 4

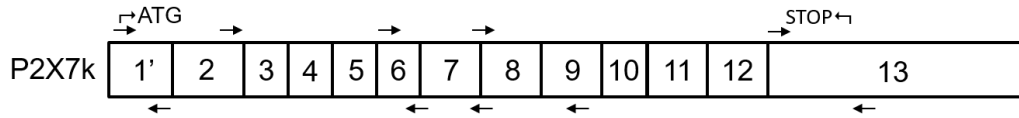
A



Exon length (pb): 288 169 69 73 97 81 130 137 91 66 150 102 1123



Exon length (pb): 116 169 69 73 97 81 130 137 91 66 150 102 1123



B

	Forward		Reverse
UTR-5' of P2X7a	5'-AAATCGGTGTGTTTCCTTTGGC-3'	Exon 1 of P2X7a	5'-CTGGATCCGGGTGACTTTGTTT-3'
Exon 1' of P2X7k	5'-ATGCAGCCATAAATCCGGGAAA-3'	Exon 1' of P2X7k	5'-CATAGCATATGGATCGGGACGC-3'
Exon 2	5'-AGACTACACCTTCCCTTGCAG-3'	Exon 6/7	5'-TGGCAAGATGTTTCTCGTGGTA-3'
Exon 6	5'-TAATATCCACTTCCCCGGCC-3'	Exon 7/8	5'-CCTGAACTGCCACCTCTGTA-3'
Exon 7/8	5'-TACAGAGGTGGCAGTTCAGG-3'	Exon 9	5'-ATCAACGTCCGCTTTTCCAC-3'
Exon 13	5'-CTGACTCCTGGACAATCTGAGG-3'	UTR-3'	5'-TCTTCAACACAGCTTACGAGGG-3'

Fig. 1S

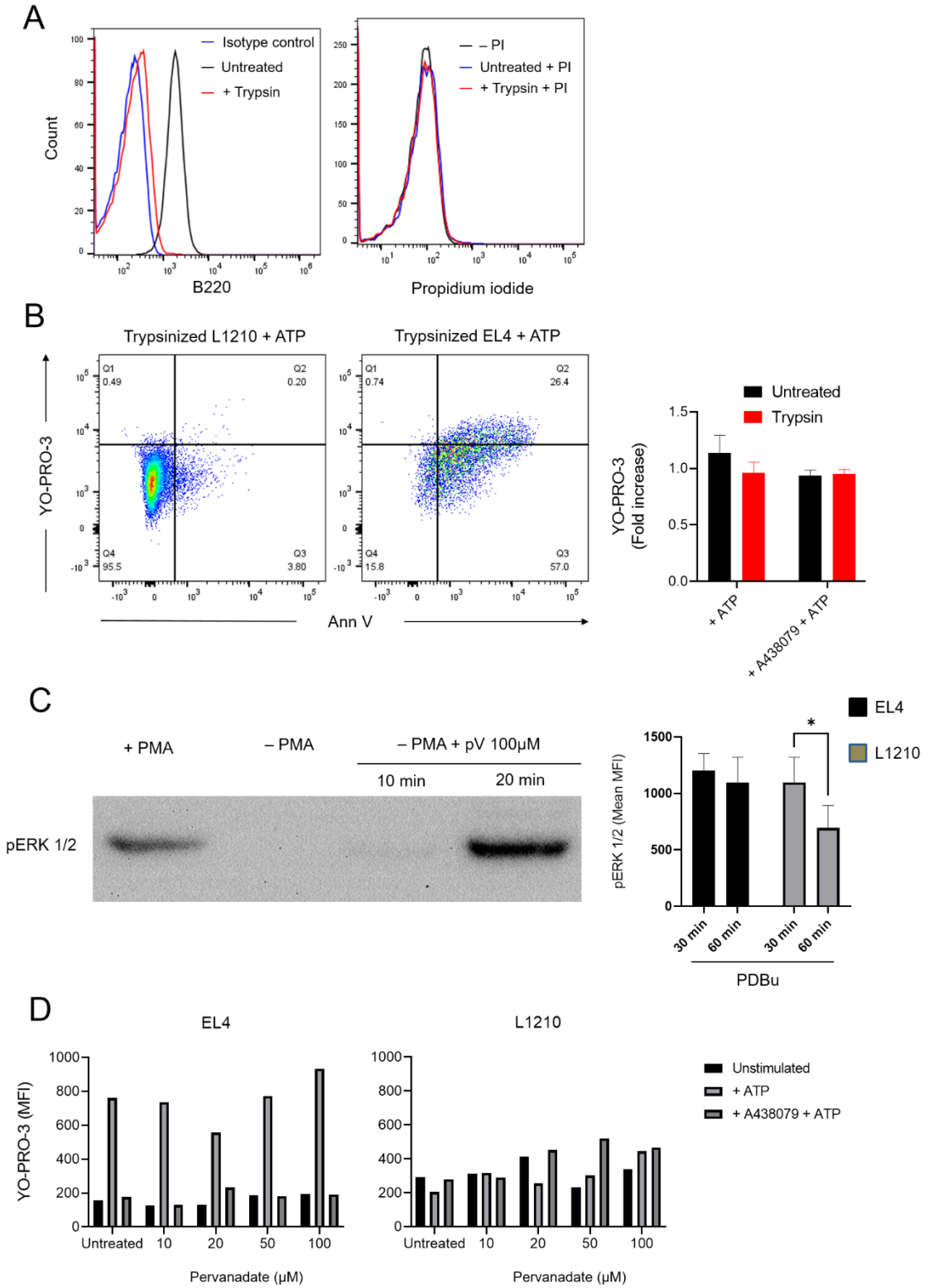


Figure S2

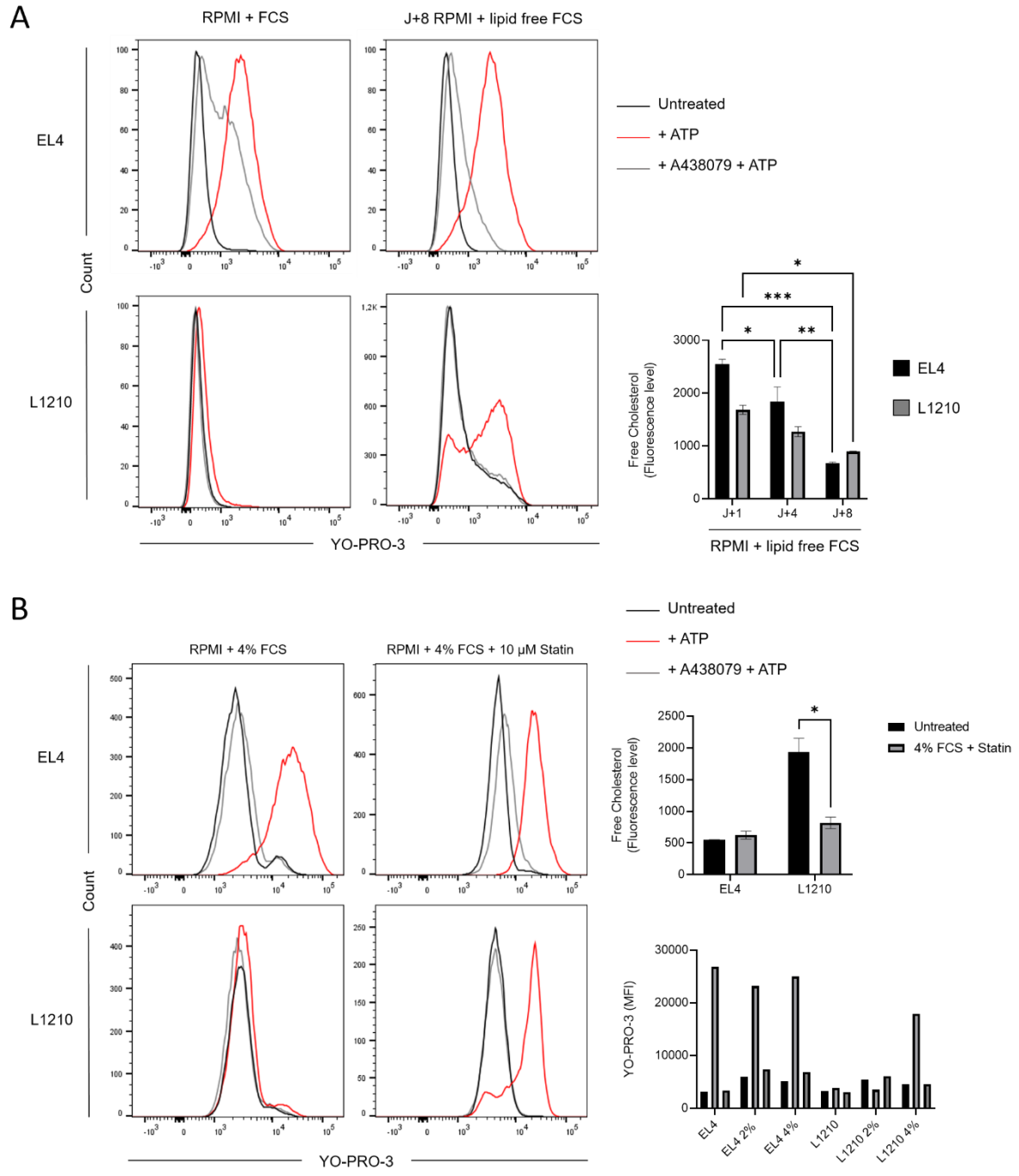


Figure S3

IV. P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis

Amine Mellouk¹, Tom Hutteau-Hamel¹, Julie Legrand², Hanaa Safya¹, Mohcine Benbijja², Françoise Mercier-Nomé^{1,3}, Karim Benihoud⁴, Jean M Kanellopoulos⁵, and Pierre Bobé^{1,2*}

Résumé :

Le syndrome lymphoprolifératif développé par les souris MRL/*lpr* dépend de l'interaction entre la mutation *lpr* du gène *fas* et le fond génétique MRL. Ainsi, la mutation *Fas^{lpr}* n'entraîne qu'un phénotype pathologique modéré dans les souris C57BL/6. Nous avons précédemment montré que les lymphocytes T pathologiques B220⁺ CD4⁻CD8⁻ (DN) des souris MRL/*lpr* présentent un défaut de fonctions cellulaires induites par le récepteur P2X7, ce qui suggère que P2X7 contribue à l'homéostasie des lymphocytes T, en synergie avec Fas. Nous avons ainsi généré des souris de la lignée B6/*lpr* KO pour P2X7 (nommée B6/*lpr*-P2X7KO). Les souris B6/*lpr*-P2X7KO accumule de grands nombres de lymphocytes T B220⁺ DN, qui expriment FasL, provenant des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD45RB^{high}CD44^{high}. Ces souris développent une néphrite lupique sévère, caractérisée par des infiltrations leucocytaires dans les tissus, de la fibrose et des forts taux en IgG anti-ADN double brin et en facteurs rhumatoïdes. Les souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent également une durée de vie considérablement réduite. P2X7 est ainsi un nouveau régulateur de l'homéostasie des lymphocytes T, dont la coopération avec le récepteur Fas est essentielle à la prévention de la lymphoaccumulation et de l'auto-immunité.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Raphaëla Goldbach-Mansky,
National Institutes of Health (NIH),
United States

REVIEWED BY

Tammy Nowling,
Medical University of South Carolina,
United States
Fabio Grassi,
Institute for Research in Biomedicine
(IRB), Switzerland

*CORRESPONDENCE

Pierre Bobé
pierre.bobe@universite-paris-saclay.fr

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 30 May 2022

ACCEPTED 30 August 2022

PUBLISHED 29 September 2022

CITATION

Mellouk A, Hutteau-Hamel T,
Legrand J, Safya H, Benbija M,
Mercier-Nomé F, Benihoud K,
Kanellopoulos JM and Bobé P (2022)
P2X7 purinergic receptor plays
a critical role in maintaining
T-cell homeostasis and
preventing lupus pathogenesis.
Front. Immunol. 13:957008.
doi: 10.3389/fimmu.2022.957008

COPYRIGHT

© 2022 Mellouk, Hutteau-Hamel,
Legrand, Safya, Benbija, Mercier-Nomé,
Benihoud, Kanellopoulos and Bobé. 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.

P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis

Amine Mellouk¹, Tom Hutteau-Hamel¹, Julie Legrand²,
Hanaa Safya¹, Mohcine Benbija², Françoise Mercier-Nomé^{1,3},
Karim Benihoud⁴, Jean M. Kanellopoulos⁵ and Pierre Bobé^{1,2*}

¹UMR 996, INSERM, Université Paris-Saclay, Clamart, France, ²Institut André Lwoff, CNRS, Université Paris-Sud, Villejuif, France, ³Plateforme d'Histologie Immunopathologie de Clamart, IPSIT, INSERM, CNRS, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, ⁴UMR 9018, Institut Gustave Roussy, CNRS, Université Paris-Saclay, Villejuif, France, ⁵Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

The severe lymphoproliferative and lupus diseases developed by MRL/*lpr* mice depend on interactions between the Fas^{*lpr*} mutation and MRL genetic background. Thus, the Fas^{*lpr*} mutation causes limited disease in C57BL/6 mice. We previously found that accumulating B220⁺ CD4⁻CD8⁻ double negative (DN) T cells in MRL/*lpr* mice show defective P2X7 receptor (P2X7)-induced cellular functions, suggesting that P2X7 contributes to T-cell homeostasis, along with Fas. Therefore, we generated a B6/*lpr* mouse strain (called B6/*lpr*-p2x7KO) carrying homozygous P2X7 knockout alleles. B6/*lpr*-p2x7KO mice accumulated high numbers of FasL-expressing B220⁺ DN T cells of CD45RB^{high}CD44^{high} effector/memory CD8⁺ T-cell origin and developed severe lupus, characterized by leukocyte infiltration into the tissues, high levels of IgG anti-dsDNA and rheumatoid factor autoantibodies, and marked cytokine network dysregulation. B6/*lpr*-p2x7KO mice also exhibited a considerably reduced lifespan. P2X7 is therefore a novel regulator of T-cell homeostasis, of which cooperation with Fas is critical to prevent lymphoaccumulation and autoimmunity.

KEYWORDS

SLE (systemic lupus erythematosus), ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome), p2x7 (purino) receptor, fas (APO-1/CD95), *lpr* mice, T cell, cell death

Introduction

Mutations of the Fas death receptor gene cause autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) (1). Fas-deficient MRL/*lpr* mice spontaneously develop ALPS and a lupus-like disease, characterized by elevated serum levels of autoantibodies and cytokines, skin rash, arthritis, vasculitis, and nephritis (2). Impaired Fas function in effector CD4 or CD8 single-positive (SP) T cells causes the accumulation of B220⁺ CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells and, ultimately, splenomegaly and lymphadenopathy (1). A DN T-cell subset that is mainly derived from CD8⁺ precursors also expands in the peripheral blood and disease-affected kidneys of systemic lupus erythematosus (SLE) patients (3, 4). B cells are also critical for full-blown ALPS. Fas deficiency in germinal-center B cells and the resulting memory B cells leads to the accumulation of autoreactive B cells, whereas Fas restoration on *lpr* B cells significantly reduces disease severity (5). Furthermore, T and B cells from MRL/*lpr* mice markedly overexpress Fas ligand (FasL), which renders them cytotoxic in vitro (6, 7) and in vivo (8, 9). As the *lpr* mutation is leaky, FasL overexpression could cause autoimmune attack on Fas^{low}-expressing tissues. Aside from the *lpr* mutation, unidentified genes in the MRL genetic background contribute to disease severity, as Fas-deficient C57BL/6 mice (B6/*lpr*) develop limited disease (10).

Numerous susceptibility loci have been discovered in SLE patients and mouse models (2, 11), including the purinergic receptor P2X7 (12, 13). The adenosine triphosphate (ATP)-gated cation channel P2X7 plays a major role in various immune processes, such as the maturation of proinflammatory cytokines (14), the proteolytic cleavage of ectodomains (15, 16), and the activation of T cells (16). Moreover, P2X7 activation can induce the differentiation of conventional and regulatory CD4⁺ T cells into proinflammatory Th17 cells during chronic inflammation (17–20). However, both detrimental and protective effects of P2X7 on autoimmune diseases have been reported (21–25). We previously showed that the regulation of ATP sensitivity in normal CD4 and CD8 SP T cells depends on their stage of activation and differentiation (26, 27). Moreover, we found that B220⁺ DN T cells that accumulate in MRL/*lpr* and B6/*lpr* mice exhibit a large reduction in P2X7 membrane expression and sensitivity to ATP (28), suggesting that the ATP/ P2X7 pathway may contribute to T-cell homeostasis, together with the Fas apoptotic pathway. Here, we therefore generated a B6/*lpr* mouse strain (called B6/*lpr*-p2x7KO) carrying homozygous P2X7 knockout alleles. During ageing, B6/*lpr*-p2x7KO mice showed massive accumulation of FasL-expressing B220⁺ DN T cells in the periphery, leading to marked splenomegaly, lymphadenopathy, and hepatomegaly. B6/*lpr*-p2x7KO sera contained high levels of IgG anti-double-stranded (ds)DNA antibodies and rheumatoid factor (RF), the proinflammatory cytokines IFN- λ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-15/IL-15R α complex,

IL-17A, and IL-23, and the B-cell survival factors IL-10 and BAFF, but only low levels of the anti-inflammatory cytokine TGF- β 1. Overall, our data strongly suggest that the P2X7 deficiency strongly amplified the mild phenotype of B6/*lpr* mice, as lymphoaccumulation, autoantibody production, and dysregulated cytokine/chemokine expression were not found in P2X7-deficient B6 mice. Finally, B6/*lpr*-p2x7KO mice showed a remarkably shortened lifespan, with 50% cumulative mortality at 20 weeks of age for female and male mice. This study reveals an unanticipated protective role for P2X7 in T-cell homeostasis and the development of ALPS and SLE.

Materials and methods

Mice

Fas deficient MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J (MRL/*lpr*, stock No. 000485), wildtype C57BL/6J (B6), P2X7-deficient B6 (B6-p2x7KO, stock No. 005576), and Fas-deficient B6 (B6/*lpr*, stock No. 000482) mouse strains were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The B6/*lpr*-p2x7KO mouse strain homozygous for both the fas^{lpr} (*lpr*) mutation and P2X7 knockout allele was generated as follows: B6/*lpr* and B6-p2x7KO mice were mated to produce F1 hybrid mice uniformly heterozygous for the *lpr* mutation and P2X7 knockout allele. Interbreeding of these F1 mice allowed the production of F2 mice (called B6/*lpr*-p2x7KO) homozygous for the *lpr* mutation and P2X7 knockout allele. All mouse strains were maintained in our animal facilities (CNRS TAAM UPS44, Orléans, France, and Plateforme Hébergement et Expérimentation Animale BUFFON, Paris, France). Although male and female B6/*lpr*-p2x7KO mice develop ALPS and lupus during ageing, the analysis of female mice were favoured in each experimental group unless indicated otherwise because of the significant female sex bias in lupus patients and lupus-prone MRL/*lpr* mice. Animal protocols were approved by local (CEEA03 and CEEA40) and national (MESRI) ethics committees for research (agreement number: D452346).

PCR-based genotyping analysis of B6/*lpr*-p2x7KO double-mutant mice

F1 and F2 generations of B6/*lpr* and B6-p2x7KO intercrosses were screened for the presence of wildtype or mutant alleles of P2X7 and *fas* genes by PCR using DNA extracted from the tails and forward 5'-TCACCACCTCCAAGCTCTTC-3' and reverse 5'-TATACTGCCCTCGGCTCTTG-3' primers for the P2X7 gene, forward 5'-GTAAATAATTGTGCTTCGTCAG-3' and reverse 5'-CAAATCTAGGCATTAACAGTG-3' primers for the *fas* gene, and forward 5'-GTAAATAATTGTGCTTCGTCAG-3' and reverse 5'-TAGAAAGGTGCACGGGTGTG-3' primers for insertion of the early transposon (ETn) into the *fas* gene (*lpr* mutation). Cycling conditions were as follows: 1 cycle at 95°C for 5 min; 30

cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 30 s, and 72°C for 45 s; and 1 cycle at 72°C for 5 min.

Single-cell suspension preparations

The single-cell suspensions were prepared from whole organs. Spleens, lymph nodes (inguinal and cervical) and thymus were mechanically dissociated in 5% fetal calf serum (FCS)-RPMI 1640 medium (Gibco, ThermoFisher Scientific) and passed through a 70 µm nylon cell strainer to obtain uniform single-cell suspensions. Bone marrow cells were flushed from the femur and tibia of one hind leg with 5% (FCS)-RPMI 1640 medium, passed through a nylon cell strainer and washed. Intrahepatic lymphocytes (IHL) were isolated as previously described (8). Briefly, whole livers were perfused to eliminate blood, cut into small pieces in 30% FCS-RPMI 1640 medium (Gibco, ThermoFisher Scientific), passed through a mesh, and washed. The cell pellet was resuspended in 20% FCS-RPMI 1640 medium and mononuclear cells were separated from hepatocytes by Ficoll density (1,090 g/ml) gradient centrifugation.

ATP-mediated cellular function assays

Assays for P2X7-mediated CD62L shedding, phosphatidylserine exposure, and pore formation were performed as previously described (26, 27). Briefly, spleen cells (10^6 cells/ml) suspended in RPMI 1640 were treated with 500 µM ATP in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 30 min. Then, cell suspensions were washed and stained for 30 min on ice with phenotype-specific fluorescent mAbs and fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb and Annexin V fluorescent conjugates to assess CD62L shedding and cell-surface exposure of phosphatidylserine (PS). To quantify P2X7-mediated pore formation, ATP treatment was performed in the presence of YO-PRO-1 or -3 fluorescent dyes (Thermo Fisher Scientific).

Lymphocyte immunophenotyping

Single-cell suspensions prepared from whole organs were phenotyped by flow cytometry using fluorescent-conjugated monoclonal antibodies (mAb) directed against the cell surface markers CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), B220 (clone RA3-6B2), CD19 (clone 1D3), IgM (clone II/41), IgD (clone 11-26), CD45RB (clone C363.16A), CD4 (clone GK1.5), CD8α (clone 53-6.7), CD69 (clone H1.2F3), CD44 (clone IM7), CD62L (clone MEL-14), CD25 (PC61.5), CTLA-4 (clone UC10-4B9), CD197/CCR7 (clone 4B12), KLRG1 (clone 2F1), CD127/IL-7 receptor-α (clone A7R34), PD-1 (clone J43), and Tim-3 (clone 2B.2C12),

the death-inducing molecules FasL (clone MFL3), Fas (clone Jo2), and Granzyme B (clone NGZB), and the transcription factors Foxp3 (clone FJK-16s) and Eomesodermin (clone Dan11mag) (eBioscience, ThermoFisher Scientific or BD Biosciences). P2X7 was detected using a rabbit polyclonal anti-P2X7 serum and fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies (eBioscience), as described previously (26–28). Fluorescent-conjugated rat or mouse IgG1, IgG2a, or IgG2b, Armenian hamster IgG mAbs, or rabbit IgG polyclonal serum were used as isotype controls (eBioscience). The use of a mAb to the mouse Fcγ receptor (clone 93, eBioscience) avoided non-specific antibody binding. At least 20,000 events were analyzed for each sample. Cell debris, dead cells, and doublets were gated out using the FSC and SSC parameters. Data acquisition was performed at the Flow Cytometry Core Facility at I2BC (Gif-sur-Yvette, France) and IPSIT (Clamart, France). Flow cytometry data were analyzed using Summit (Beckman Coulter) and FlowJo (Treestar) software. The immunophenotyping of the different CD4 or CD8 single-positive (SP) and B220⁺ CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) CD90⁺ T-cell subsets have been identified and gated using a sequential gating strategy (Figure S1).

Quantification of anti-dsDNA antibody, RF, cytokine, and soluble FasL levels

Serum levels of IgG anti-dsDNA autoantibodies were quantified using an anti-dsDNA ELISA kit (Signosis), according to the manufacturer's instructions. Serum levels of IgG2a anti-dsDNA and IgG-RF autoantibodies were quantified by ELISA as previously described (29). Briefly, 96-well plates were coated either with calf-thymus dsDNA or rabbit IgG (Sigma-Aldrich) and blocked with 1% bovine serum albumin solution. Serial serum dilutions were added in triplicate and the plates incubated at room temperature for 2 h and then washed. Bound IgG2a anti-dsDNA and IgG RF were detected using alkaline phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG2a and IgG, respectively, and para-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma-Aldrich). The OD was determined at 405 nm. Serum levels of MCP-1/CCL2, MIP-1α/CCL3, MIP-1β/CCL4, RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7, Eotaxin/CCL11, GROα/CXCL1, MIP-2/CXCL2, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, BAFF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-15/IL-15R complex, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-23, IL-27, IL-28/IFN-λ, IL-31, LIF, M-CSF, G-CSF/CSF-3, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, TGF-β1, TNF-α, and soluble FasL were assayed using the cytokine & chemokine 36-Plex Mouse ProcartaPlex Kit, TGF beta 1 Mouse Simplex ProcartaPlex Kit (eBioscience, Thermo Fisher Scientific), Mouse BAFF/BLyS/TNFSF13B, Mouse/Rat IL-33 and the Mouse Fas Ligand/TNFSF6 Quantikine ELISA Kits (R&D systems, Minneapolis, MN), following the manufacturers' instructions.

Determination of biochemical parameters

Serum urea, aspartate aminotransferase (ASAT), and lactate dehydrogenase (LDH) levels were quantified using an automated analyser (Olympus AU400 Clinical Chemistry Analyzer, Biochemistry laboratory facility, UMR1149 INSERM-Université Paris Diderot, France).

Histopathological and immunohistofluorescence analyses

Kidney, liver, and lung samples were fixed overnight with zinc formalin fixative (Sigma-Aldrich) and then embedded in paraffin. Tissue sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin, Picro-Sirius red, or Masson's trichrome (Microm-Microtech; France). Slides were scanned using a NanoZoomer 2.0-RS digital slide scanner and 2 \times , 10 \times , or 30 \times objective lenses with a numerical aperture of 0.75 (Hamamatsu Photonics), and images were analyzed using NDP View2 software (Hamamatsu Photonics). Immunohistofluorescence staining was performed on paraffin sections using primary antibodies against the pan-T cell marker CD3 (clone CD3-12, Abcam; 1/250) and the macrophage marker CD68 (PA5-89134, Thermo Fisher Scientific; 1/200), followed by staining with appropriate secondary antibodies Alexa FluorTM 488 and Alexa FluorTM 594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 1/100). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen; Molecular Probes; 1/300).

Statistical analysis

Data were expressed as means with standard deviations (SD). A value of more than three SDs from the mean served as criterion to exclude outliers. Data were analyzed using GraphPad Prism 9.4.0 software (La Jolla, CA). The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of data distribution. The two-tailed Student's *t*-test for unpaired data was used to compare the mean of two independent groups. Where two independent variables were considered, two-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey post hoc test was used to compare the means of more than two groups. Statistical significance is indicated as follows: ns, not significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Results

B6/*lpr*-*p2x7*KO mice develop massive lymphadenopathy and splenomegaly

We previously reported that pathogenic B220⁺ DN T cells from MRL/*lpr* or B6/*lpr* mice show a strong reduction of P2X7

membrane expression and sensitivity to extracellular ATP (28). We generated a B6/*lpr* mouse strain carrying homozygous P2X7 knockout alleles (named B6/*lpr*-*p2x7*KO) to determine whether the downexpression of P2X7 on B220⁺ DN T cells contributes to their accumulation in *lpr* mice. B6/*lpr* mice were chosen because they develop only mild lymphoaccumulation relative to MRL/*lpr* mice. B6/*lpr*-*p2x7*KO mice were produced by crossing B6/*lpr* and B6-*p2x7*KO mice. Double-mutant mice were selected in the F2 generation by PCR-based genotyping. The absence of P2X7 and Fas on splenocytes of F2 mice was confirmed by flow cytometry quantification of ATP-induced cellular functions and P2X7 and Fas membrane expression (Figures S2A, B). Unlike the parental strains, B6/*lpr*-*p2x7*KO mice developed unexpected massive hyperplasia of the peripheral lymphoid organs comparable to those of MRL/*lpr* mice (Figures 1A, B). The weight of the spleen and LNs in six-month-old B6/*lpr*-*p2x7*KO mice was 4 to 6 times higher than in age-matched B6/*lpr* mice (Table 1). The increased size of these lymphoid organs was due to increased cell numbers, mostly T cells. Although the absolute B-cell numbers were unchanged in B6/*lpr*-*p2x7*KO mice, their percentage was markedly reduced due to the massive increase in absolute T-cell numbers (Figures 1B, C, S2C). Moreover, B6/*lpr*-*p2x7*KO mice showed a remarkably reduced lifespan, with 50% cumulative mortality at 20 weeks of age for both male and female mice (Figure 1D; Table 2). Therefore, B6/*lpr*-*p2x7*KO mice develop a more rapid and severe form of disease than B6/*lpr* mice.

Massive accumulation of B220⁺ DN T cells in B6/*lpr*-*p2x7*KO spleens and LNs

T cells that accumulate in MRL/*lpr* mice mainly express the B220⁺ DN phenotype (29). We thus immunophenotyped B6/*lpr*-*p2x7*KO splenocytes (Figure 2) and LN cells (data not shown) to characterize and quantify the T-cell subpopulations. B6/*lpr*-*p2x7*KO mice showed significantly higher absolute numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and DN T cells than the parental strains (Figure 2A). However, the percentage of CD4⁺ T cells among all T cells was unchanged in B6/*lpr*-*p2x7*KO mice, whereas it was significantly lower for CD8⁺ T cells and higher for DN T cells (Figure 2B). Moreover, DN T cells expressed the transmembrane phosphatase B220 (Figure 2C) and their numbers were markedly higher in B6/*lpr*-*p2x7*KO females than males (data not shown). In sharp contrast to B6/*lpr*-*p2x7*KO mice, < 3% B220⁺ DN T cells were found in age-matched B6 and B6-*p2x7*KO mice (Figure 2C).

Kinetics of B220⁺ DN T-cell accumulation in B6/*lpr*-*p2x7*KO mice

Macroscopically, adenopathy developed later in the B6/*lpr*-*p2x7*KO than MRL/*lpr* mice. The diameter of the cervical LN was

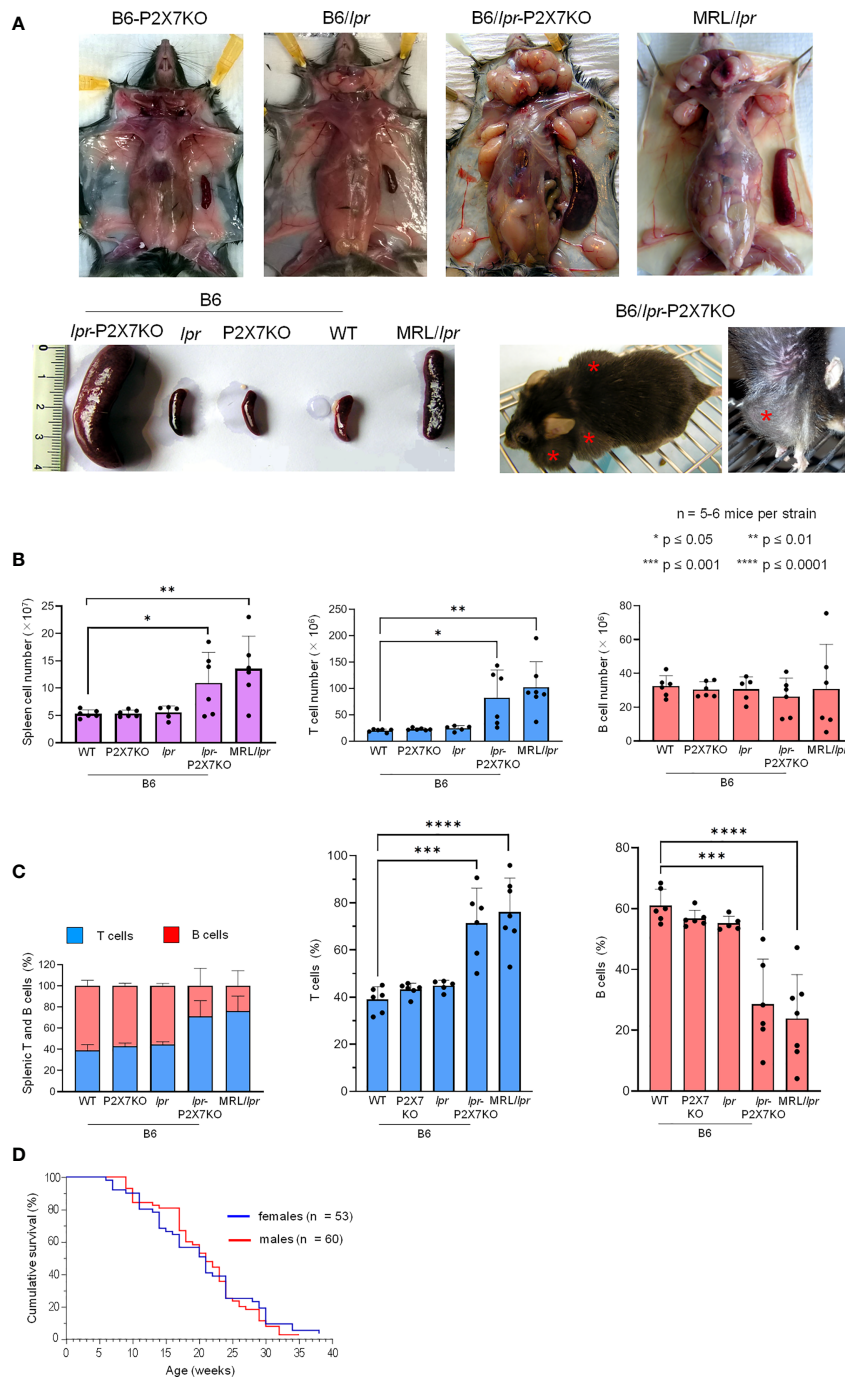


FIGURE 1

B6/*lpr*-*p2x7*KO mice show a shortened lifespan and develop massive hyperplasia of the secondary lymphoid organs with aging due to the accumulation of T lymphocytes. Representative images of cervical, axillary, and inguinal lymph nodes and spleens (A) of 7- to 8-month-old female B6 (WT), B6-*p2x7*KO, B6/*lpr* and B6/*lpr*-*p2x7*KO mice and 4-month-old female MRL/*lpr* mice. The massive hyperplasia of lymph nodes is noticeable in a whole body image of living B6/*lpr*-*p2x7*KO mice (A, bottom panel, red asterisks). (B, C) Spleen cells of 7- to 8-month-old female WT, B6-*p2x7*KO, B6/*lpr* and B6/*lpr*-*p2x7*KO mice and 4-month-old female MRL/*lpr* mice were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90 and B220 or isotype controls and analyzed by flow cytometry. Bar graphs show the absolute number (B) and percentage (C) of splenic leukocytes (■), CD90⁺ T cells (■) and CD90⁻B220⁺ B cells (■) from each mouse strain. Stacked bar graphs show the respective proportions of the T and B cells in each mouse strain. Data are expressed as mean (SD) of 5-6 mice per strain, and each dot in the bar graphs represents an individual mouse. Error bars in graphs show SD. (D) Kaplan-Meier graph showing the cumulative survival rate by age for female (n = 53) and male (n = 60) B6/*lpr*-*p2x7*KO mice. Asterisks above horizontal lines indicate statistically significant differences assessed with unpaired two-tailed *t*-test. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001 ****p ≤ 0.0001.

TABLE 1 Organ weights of B6/*lpr-p2x7KO* mice compared to parental strains and MRL/*lpr* mice.

	B6- <i>p2x7KO</i> *** (n=7)*	B6/ <i>lpr</i> (n=7)	B6/ <i>lpr-p2x7KO</i> (n=8)	MRL/ <i>lpr</i> (n=6)
Axillary LN**	0.007 (0.004)	0.054 (0.072)	0.338 (0.228)	0.257 (0.144)
Mesenteric LN	0.064 (0.021)	0.199 (0.226)	0.782 (0.243)	0.902 (0.368)
Spleen	0.090 (0.031)	0.200 (0.085)	0.787 (0.818)	0.880 (0.474)
Liver	1.800 (0.178)	1.790 (0.206)	2.276 (0.587)	2.637 (0.483)

*n corresponds to the number of mice per group; **Organ weight in g. Results are expressed as mean (SD) from 6-8 mice per strain. LN= lymph node; ***7- to 8-month-old B6-*p2x7KO*, B6/*lpr* and B6/*lpr-p2x7KO* and 4-month-old MRL/*lpr* mice.

15.37 mm (SD: 5.98, n = 14) in MRL/*lpr* and B6/*lpr-p2x7KO* mice at 12 and 16 weeks of age, respectively, suggesting distinct kinetics of lymphoaccumulation between the two strains. Thus, we monitored the accumulation of B220⁺ DN T cells in the LNs over time. They represented 17% of total T cells in 12-week-old B6/*lpr* and B6/*lpr-p2x7KO* mice and nearly 45% in age-matched MRL/*lpr* mice. The percentage of B220⁺ DN T cells continued to increase well beyond 12 weeks of age for the B6/*lpr-p2x7KO* but not B6/*lpr* mice, reaching that of MRL/*lpr* mice at 30 weeks of age (Figure 2D). In summary, although B6/*lpr* mice generated B220⁺ DN T cells with aging, only B6/*lpr-p2x7KO* mice produced the high numbers found in MRL/*lpr* mice. Overall, our data strongly suggest that the *fas* and *p2x7* mutations synergize to strongly amplify the mild lymphoproliferative syndrome of B6/*lpr* mice.

CD8 SP origin of B220⁺ DN T lymphocytes in B6/*lpr-p2x7KO* mice

As the increased percentage of DN T cells in B6/*lpr-p2x7KO* spleens was counterbalanced by the decreased percentage of CD8⁺ but not CD4⁺ T cells (Figure 2B), we examined whether B6/*lpr-p2x7KO* DN T cells originate from CD8 SP T cells by quantifying the levels of membrane-anchored CD8 and the transcription factor eomesodermin (Eomes). Eomes plays a central role in CD8⁺ T-cell homeostasis and function (30) and Th1 lineage commitment (31). CD8, but not CD4, median fluorescent intensity (MFI) values were markedly lower in B6/*lpr-p2x7KO* T cells and also, albeit a lesser extent, in B6/*lpr* T cells than in B6 and B6-*p2x7KO* T cells. CD8 MFI values were

TABLE 2 Summary of the major phenotypic characteristics of B6/*lpr-p2x7KO* mice compared to parental strains and the MRL/*lpr* mouse model of ALPS and SLE diseases.

Mouse strain	B6	B6- <i>p2x7KO</i>	B6/ <i>lpr</i>	B6/ <i>lpr-p2x7KO</i>	MRL/ <i>lpr</i>	
50% mortality (months)	> 24	> 24	14-17	5	4-6	
B220 ⁺ DN T cell numbers	Spleen	-	-	+	++++	++++
	Liver	-	-	-	++++	-
Anti-dsDNA Ab*	4 (2.2)	2 (1.3)	33 (19.4)	168 (52)	151 (78)	
Lymphoid infiltrates	Lung	-	-	-	++++	++++
	Kidney	-	-	-	++++	++++
	Liver	-	-	-	++++	-
	Skin	-	-	-	+/-	++++
Cytokines	TGF-β*	6 (2)	5.7 (2.8)	1.6 (1.3)	1.12 (0.6)	1.98 (0.9)
	IL-10**	23 (22.4)	19 (10)	92 (105)	126 (80.8)	93 (68.5)
	IFN-λ**	70 (14.3)	69 (14)	198 (92)	369 (325)	150 (118)
	IL-15/IL-15R**	0.16 (0.5)	0	7.6 (9.5)	33 (42.5)	0.90 (2.8)
	BAFF*	13 (0.5)	13.4 (5.3)	9.5 (0.6)	18 (3.7)	21.8 (1.8)
	IL-6**	33 (6.6)	23 (18)	173 (112)	277 (153)	277 (223)
	IL-1β**	3 (2.2)	5 (4)	18 (11.6)	36 (23.5)	11 (11)
	TNF-α**	6 (2)	6.6 (1.6)	10.3 (3.6)	19 (9.2)	83 (83.6)
	IFN-γ**	8 (5.4)	10 (9.6)	84 (68.7)	103 (125)	36 (30.3)
IL-17A**	0.3 (0.6)	0.9 (1.1)	4.4 (4.9)	6.2 (6.5)	2 (3.9)	
FasL	Soluble	+	-	+++	+++	++++
	Transmembrane	+	+	+	++	+++

+/-, very low level; +, low level; ++, moderate level; +++, high level; +++++, very high level; *ng/ml; **pg/ml, Results are expressed as mean (SD), n = 5-11 mice per strain.

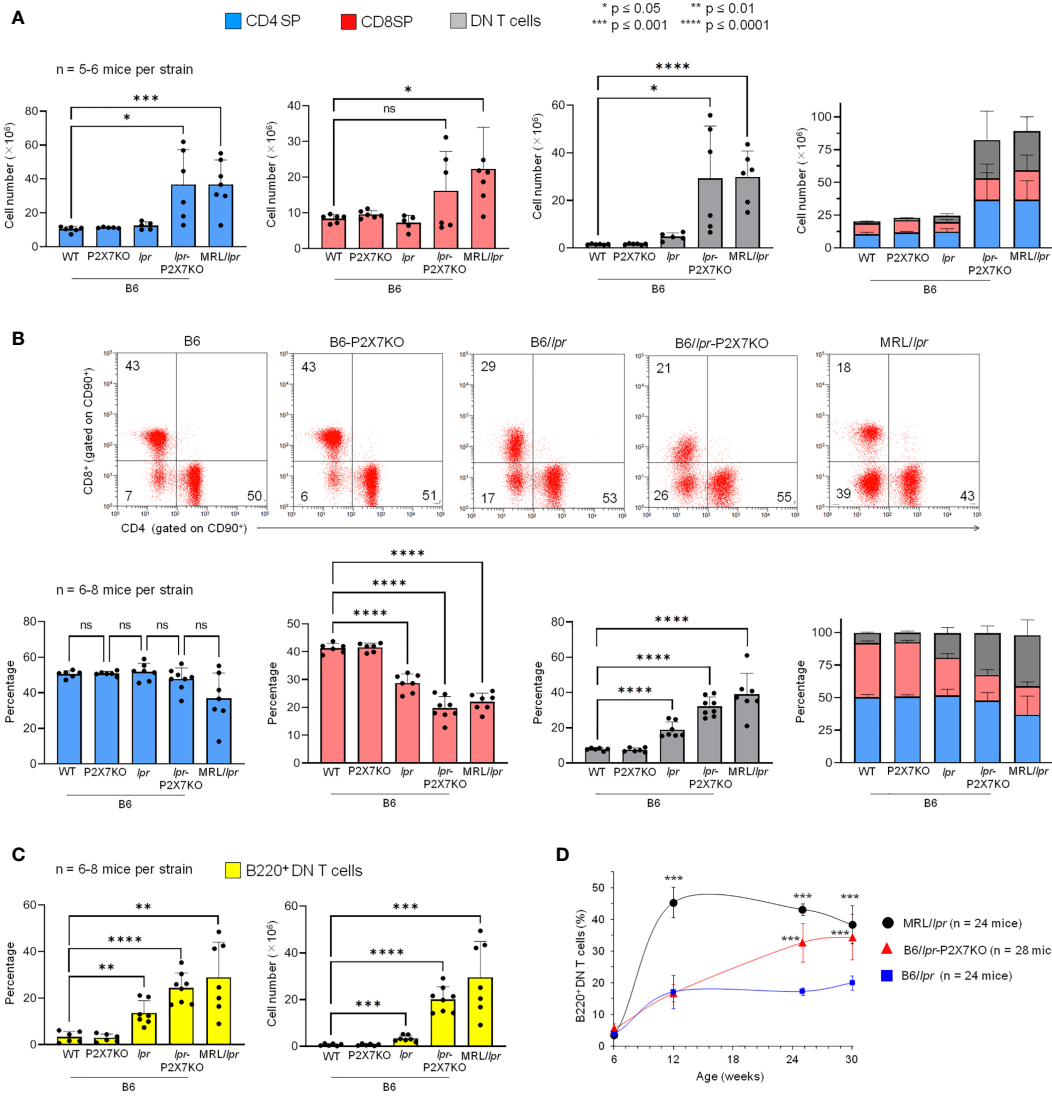


FIGURE 2

Quantification of the percentage and absolute number of SP, DN, and B220⁺ DN T cells and level of CD4 and CD8 on SP T cells in B6/*lpr*-*p2x7KO* mice and parental strains. Spleen cells from 7- to 8-month-old female B6, B6-*p2x7KO*, B6/*lpr* and B6/*lpr*-*p2x7KO* mice and 4-month-old female MRL/*lpr* mice were stained with either fluorescent mAbs against the phenotypic markers CD90, B220, CD4, and CD8 or isotype controls and analyzed by flow cytometry. Bar graphs show the absolute number (A) and percentage (B) of CD4 SP (■), CD8 SP (▲) and DN (■) T cells among CD90⁺ T cells from each mouse strain. Data are expressed as mean (SD) of 5-8 mice per strain and each dot in the bar graphs represents an individual mouse. Stacked bar graphs (A, B) show the respective proportions of SP and DN CD90⁺ T cells in each mouse strain. Error bars in graphs show SD. (B) Representative flow cytometry plots of CD4 and CD8 expression in gated CD90⁺ T cells. (C) Bar graphs show the percentage and absolute number of B220⁺ DN CD90⁺ T cells from each mouse strain. Data are expressed as mean (SD) of 6-8 mice per strain. (D) Kinetics of B220⁺ DN CD90⁺ T cell accumulation in LNs of B6/*lpr* (■), B6/*lpr*-*p2x7KO* (▲), and MRL/*lpr* (●) mice measured by flow cytometry. Data are expressed as mean (SD) of 6-7 mice per time point. Error bars in graphs show SD. Asterisks above horizontal lines indicate statistically significant differences assessed with unpaired two-tailed t-test. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ and ns, not significant.

unchanged in MRL/*lpr* T cells (Figure 3A). The percentage of Eomes⁺ CD4⁺ T cells and, to a lesser extent, their Eomes MFI values were significantly higher in B6/*lpr* and B6/*lpr*-*p2x7KO* mice than in B6 and B6-*p2x7KO* mice (Figure 3B), indicating

higher numbers of Th1 cells in both *lpr* strains. Similarly, the CD8⁺ T-cell population showed a 40% higher abundance of Eomes⁺ cells in *lpr* than non-*lpr* mice, along with significantly higher Eomes MFI values (Figure 3B), suggesting that *lpr* CD8⁺

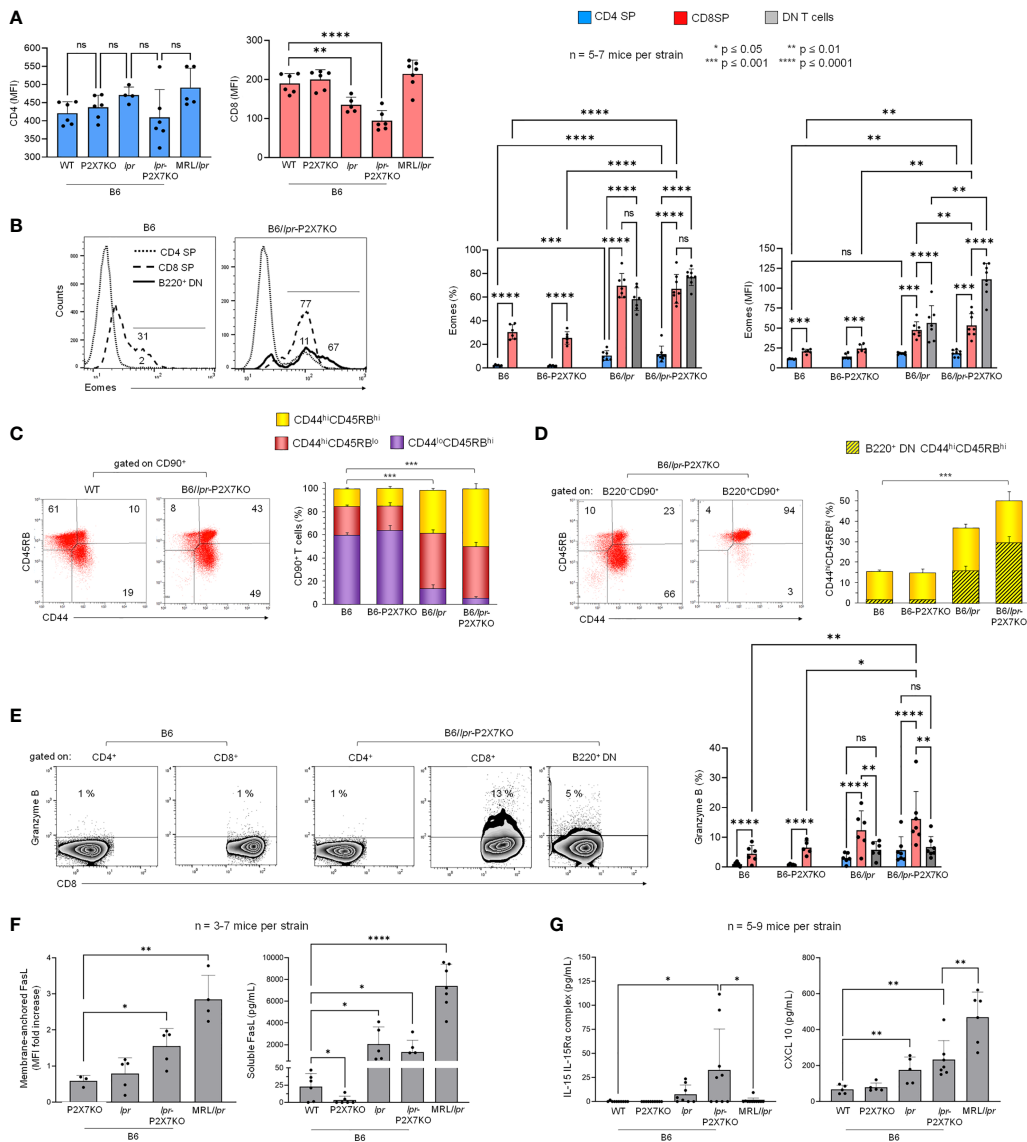


FIGURE 3

Cellular origin and activation state of B220⁺ DN T lymphocytes that accumulate in B6/*lpr-p2x7ko* mice. Spleen cells from 7- to 8-month-old female B6, B6-*p2x7ko*, B6/*lpr* and B6/*lpr-p2x7ko* and 4-month-old female MRL/*lpr* mice were stained with either fluorescent mAbs against the phenotypic and functional markers CD90, B220, CD4, CD8, CD44, CD45RB, FasL, Eomes, and Granzyme B or isotype controls and analyzed by flow cytometry. (A) Bar graphs show the mean (SD) of median fluorescent intensity (MFI) values for CD4 and CD8 expression on SP CD90⁺ T cells from each mouse strain (n = 5-7 mice per strain). (B) Representative flow cytometry histograms of Eomes intracellular staining gated on CD4 SP, CD8 SP and B220⁺ DN CD90⁺ T cells. Bar graphs show the percentage of Eomes⁺ cells (left) and Eomes MFI (right) in gated CD4⁺ (■), CD8⁺ (■), and B220⁺ DN (■) CD90⁺ T cells from each mouse strain. Data are expressed as mean (SD) of 5-7 mice per strain. (C, D) Representative flow cytometry plots of CD44/CD45RB staining. CD44 versus CD45RB expression allowed to determine the percentages of naive (CD44^{lo}CD45RB^{hi}) and effector/memory (either CD44^{hi}CD45RB^{lo} or CD44^{hi}CD45RB^{hi}) cells in whole CD90⁺ T cells (C) and in B220⁻ SP (either CD4 or CD8) and B220⁺ DN CD90⁺ T cells (D). Stacked bar graphs show (C) the respective proportions of naive (CD44^{lo}CD45RB^{hi}) and effector/memory (either CD44^{hi}CD45RB^{lo} or CD44^{hi}CD45RB^{hi}) cells in CD90⁺ T cells and (D) the proportion of B220⁺ DN cells (■) in CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory CD90⁺ T cells (■) from each mouse strain. Data are expressed as mean (SD) of 5-7 mice per strain. (E) Representative flow cytometry dot plots of Granzyme B/CD8 staining in gated CD4 SP, CD8 SP and B220⁺ DN CD90⁺ T cells. Bar graphs show the percentage of Granzyme B⁺ cells in gated CD4⁺ (■), CD8⁺ (■), and B220⁺ DN (■) CD90⁺ T cells from each mouse strain. Data are expressed as mean (SD) of 5-7 mice per strain. (F, G) Membrane-anchored FasL (F, left) on CD90⁺ T cells from each mouse strain. Data are shown as mean fold increase (SD, n = 3-7 mice per strain) in FasL MFI on CD90⁺ T cells relative to staining with an isotype control mAb. Serum levels of soluble FasL (F, right), IL-15/IL-15R complex (G, left), and CXCL10 (G, right) measured by ELISA in the sera of 6- to 7-month-old female B6, B6-*p2x7ko*, B6/*lpr*, and B6/*lpr-p2x7ko* mice and 4-month-old female MRL/*lpr* mice. Data are shown as mean (SD) of 5-7 mice per strain. Each dot in the bar graphs represents an individual mouse. Error bars in graphs show SD. Asterisks above horizontal lines indicate statistically significant differences assessed with unpaired two-tailed *t*-test in (A, C, D, F, G) and two-way ANOVA with a Tukey *post hoc* test in (B, E). **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001, *****p* ≤ 0.0001 and ns, not significant.

T cells are more highly activated. Importantly, 60 to 75% of pathogenic B220⁺ DN T cells from *lpr* mouse strains expressed Eomes, for which the MFI values were similar to those of CD8⁺ T cells in B6/*lpr* mice and two-fold higher than those of CD8^{low} T cells in B6/*lpr-p2x7KO* mice (Figure 3B).

We recently reported that effector/memory CD8⁺ and CD4⁺ T-cell subpopulations from B6 mice are mainly of the CD44^{hi}CD45RB^{hi} and CD44^{hi}CD45RB^{lo} phenotype, respectively (27). Therefore, we analyzed CD44 and CD45RB expression on T cells from B6/*lpr-p2x7KO* mice and the parental strains. Approximately 40% of splenic T cells from B6 and B6-*p2x7KO* mice showed the CD44^{hi}CD45RB^{hi} or CD44^{hi}CD45RB^{lo} effector/memory phenotype (Figure 3C), whereas the value was 70% to 90% in B6/*lpr* and B6/*lpr-p2x7KO* mice (Figure 3C). Similarly to CD8⁺ T cells, almost all B220⁺ DN T cells showed a CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory phenotype (Figure 3D). Overall, our data suggest that effector/memory Eomes⁺ CD44^{hi}CD45RB^{hi} CD8⁺ T cells from B6/*lpr-p2x7KO* mice downregulate the expression of membrane-anchored CD8 and become pathogenic Eomes^{high} B220⁺ DN T cells.

High numbers of granzyme B⁺ CD8⁺ and FasL⁺ DN T cells in B6/*lpr-p2x7KO* mice

We investigated the cytotoxic potential of the B6/*lpr-p2x7KO* T-cell subpopulations by quantifying their levels of granzyme B (GzmB) and membrane-anchored FasL. GzmB⁺ cell numbers were significantly higher among CD8⁺ T cells than among CD4⁺ and pathogenic B220⁺ DN T cells, irrespective of the mouse strain studied (Figure 3E). Membrane-anchored FasL was overexpressed on T cells from B6/*lpr-p2x7KO* mice but not those from age-matched parental strains (Figure 3F). Moreover, soluble FasL, a biomarker of ALPS found to be overexpressed in certain SLE patients (32, 33), was measured at high levels in B6/*lpr*, B6/*lpr-p2x7KO*, and MRL/*lpr* sera (Figure 3F).

Furthermore, serum levels of IL-15/IL-15R α complexes, which upregulate CD8⁺ T-cell homeostasis and function (34), were highly elevated in B6/*lpr-p2x7KO* mice, with levels 5 to 20 times higher than those in B6/*lpr* and MRL/*lpr* mice, respectively (Figure 3G). Single mutant B6-*p2x7KO* and wildtype B6 mice had similar low levels of IL-15/IL-15R α complexes. Elevated serum levels of the chemokine CXCL10, which regulates the migration of effector CXCR3⁺ CD8⁺ T cells and GzmB production (35), were also found in B6/*lpr-p2x7KO* mice, although to a lesser extent than in MRL/*lpr* mice (Figure 3G). Overall, our data suggest that CD8 SP and DN T cells might be a source of potent cytotoxic T cells with strong ability to contribute to the severity of the lupus disease in B6/*lpr-p2x7KO* mice.

Massive leukocyte infiltration into various tissues of B6/*lpr-p2x7KO* mice

Pulmonary disease and nephritis are an important cause of morbidity and mortality in SLE patients. Histological analysis of lung and kidney sections from B6/*lpr-p2x7KO* mice showed an abnormal structure, with widespread peribronchiolar, periglomerular, and perivascular mononuclear cell infiltrates (Figure 4A) consisting predominantly of CD68⁺ macrophages and T cells in renal tissue (Figure 4B). Leukocyte infiltrates were never found in B6/*lpr* and wildtype B6 tissues. Hepatomegaly and/or liver disease can occur in certain SLE patients. Interestingly, B6/*lpr-p2x7KO* mice, but not the parental strains, exhibited increased liver weights (Table 1), consistently associated with the presence of perivascular and parenchymal mononuclear cell infiltrates (Figure 4A). Tissue injury in B6/*lpr-p2x7KO* mice was confirmed by large areas of renal tissue fibrosis (Figure 4B) and elevated serum levels of urea (17.8 mM), ASAT (899.5 U/L), and LDH (4352 U/L). Overall, our data suggest that early mortality in B6/*lpr-p2x7KO* mice is primarily due to renal failure.

B220⁺ DN T cells massively infiltrate B6/*lpr-p2x7KO* livers

We isolated and immunophenotyped intrahepatic lymphocytes (IHLs). CD4⁺ and CD8⁺ IHL counts were significantly higher in B6/*lpr-p2x7KO* mice than in the parental strains and even MRL/*lpr* mice (Figure 4C). Similarly, B220⁺ DN T-cell numbers were 7- and 10-fold higher among IHLs from B6/*lpr-p2x7KO* than MRL/*lpr* and B6/*lpr* mice, respectively.

Memory T-cell subsets predominate within the T-cell population of B6/*lpr-p2x7KO* mice

The high levels of IL-15/IL-15R α complexes in B6/*lpr-p2x7KO* mice led us to assess the predominance of effector memory (TEM) and central memory (TCM) T-cell subsets within the SP and DN T-cell subsets from B6/*lpr-p2x7KO* mice, as IL-15/IL-15R α complexes regulate their expansion. B6/*lpr-p2x7KO* and B6/*lpr* mice exhibited a lower percentage of CD44^{lo}CD62L⁺ naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells, but a higher percentage of CD44^{hi}CD62L⁻CCR7⁻ TEM and CD44^{hi}CD62L⁺CCR7⁺ TCM subsets than B6 and B6-*p2x7KO* mice (Figures 5A, B). Interestingly, most pathogenic B220⁺ DN T cells from B6/*lpr-p2x7KO* and B6/*lpr* mice had an unusual

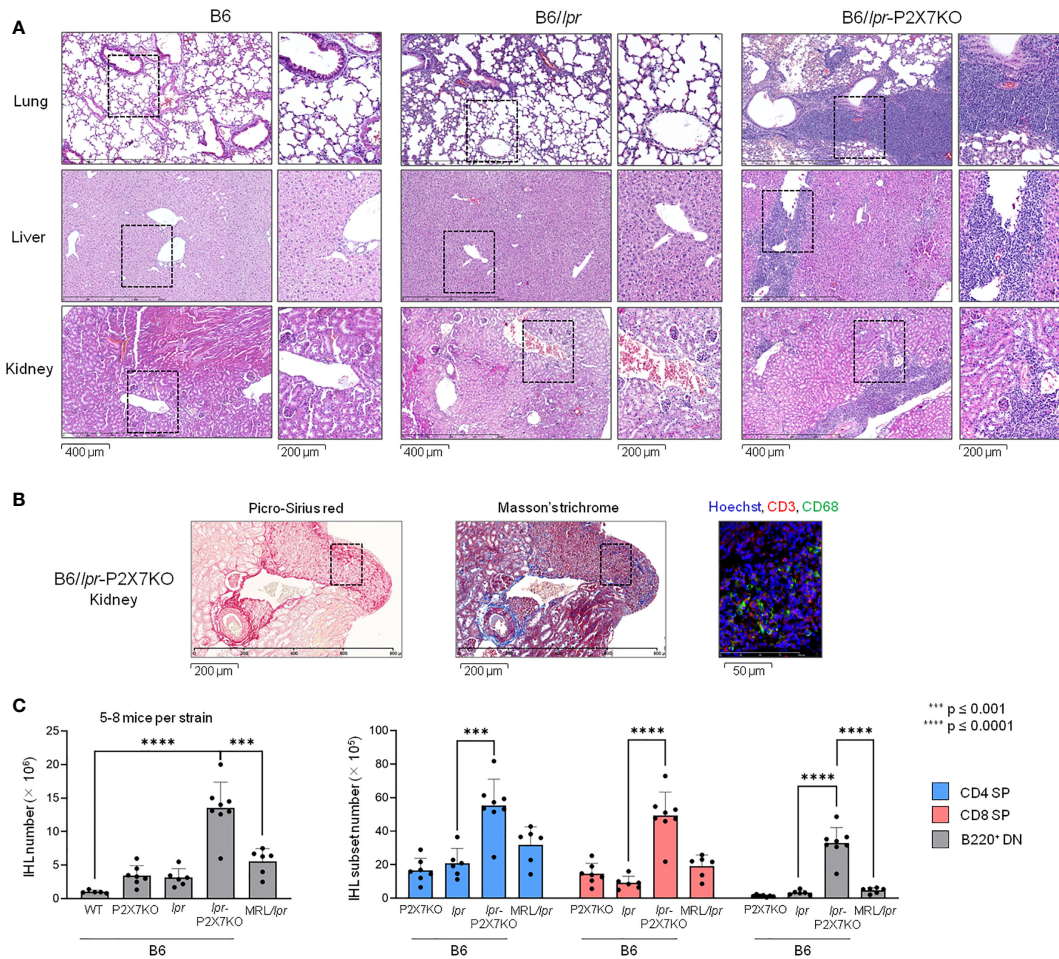


FIGURE 4 Massive leukocyte infiltration in the liver, lungs, and kidneys of B6/lpr-p2x7KO mice. (A) Representative photomicrograph (bar scale = 400 μm) of histological examination of mononuclear cell infiltrates in lung, kidney, and liver sections from 6- to 7-month-old female B6, B6/lpr and B6/lpr-p2x7KO mice. The corresponding position of the inset is indicated by a black dotted line in the photomicrographs. The inset photomicrograph (bar scale = 200 μm) is shown in the second column of the panel for each mouse strain and tissue. Histological photomicrographs were captured using a digital camera. (B) Renal tissue sections from B6/lpr-p2x7KO mice were labelled with anti-CD68 and anti-CD3 fluorescent mAbs. Sections were stained with picro-sirius red and Masson's trichrome to detect renal fibrosis. (C) Infiltrating leukocytes isolated from individual livers of 7- to 8-month-old female B6/lpr, B6-p2x7KO and B6/lpr-p2x7KO mice and 4-month-old female MRL/lpr mice were stained with either fluorescent mAbs against the phenotypic markers CD90, B220, CD4, and CD8 or isotype controls and analyzed by flow cytometry. Bar graphs show the mean percentage (SD, n = 5-8 livers per strain) of total CD90⁺ T cells (IHL, left panel), as well as CD4⁺ (■), CD8⁺ (■) and B220⁺ DN (■) CD90⁺ T-cell subsets. Each dot in the bar graphs represents an individual mouse. Error bars in graphs show SD. Asterisks above horizontal lines indicate statistically significant differences assessed with unpaired two-tailed t-test. ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001.

CCR7-negative CD44^{hi}CD62L⁺ phenotype (Figure 5C), along with a CD45RB^{hi} phenotype (Figure 3C), reminiscent of the human EMRA phenotype [CD45RA^{hi}CD44^{hi}CCR7⁻ (36, 37)] of chronically activated CD8⁺ T cells. Overall, our data suggest that SP and DN T-cell subsets from lpr mice, especially B6/lpr-p2x7KO mice, are chronically activated, as observed under conditions of severe autoimmunity. Therefore, we evaluated whether such chronic activation drives T cells to an exhausted fate. However, PD-1⁺Tim-3⁺ T cells were completely absent from B6/lpr-p2x7KO mice (Figures 5D, E), indicating that the

accumulating T cells in B6/lpr-p2x7KO mice do not show phenotypic features of an exhausted state.

Normal percentage of DP and SP thymocytes but an elevated percentage of pre-B cells in B6/lpr-p2x7KO mice

Absolute numbers of T cells, but not B cells, were strongly elevated in B6/lpr-p2x7KO mice (Figure 1). We therefore

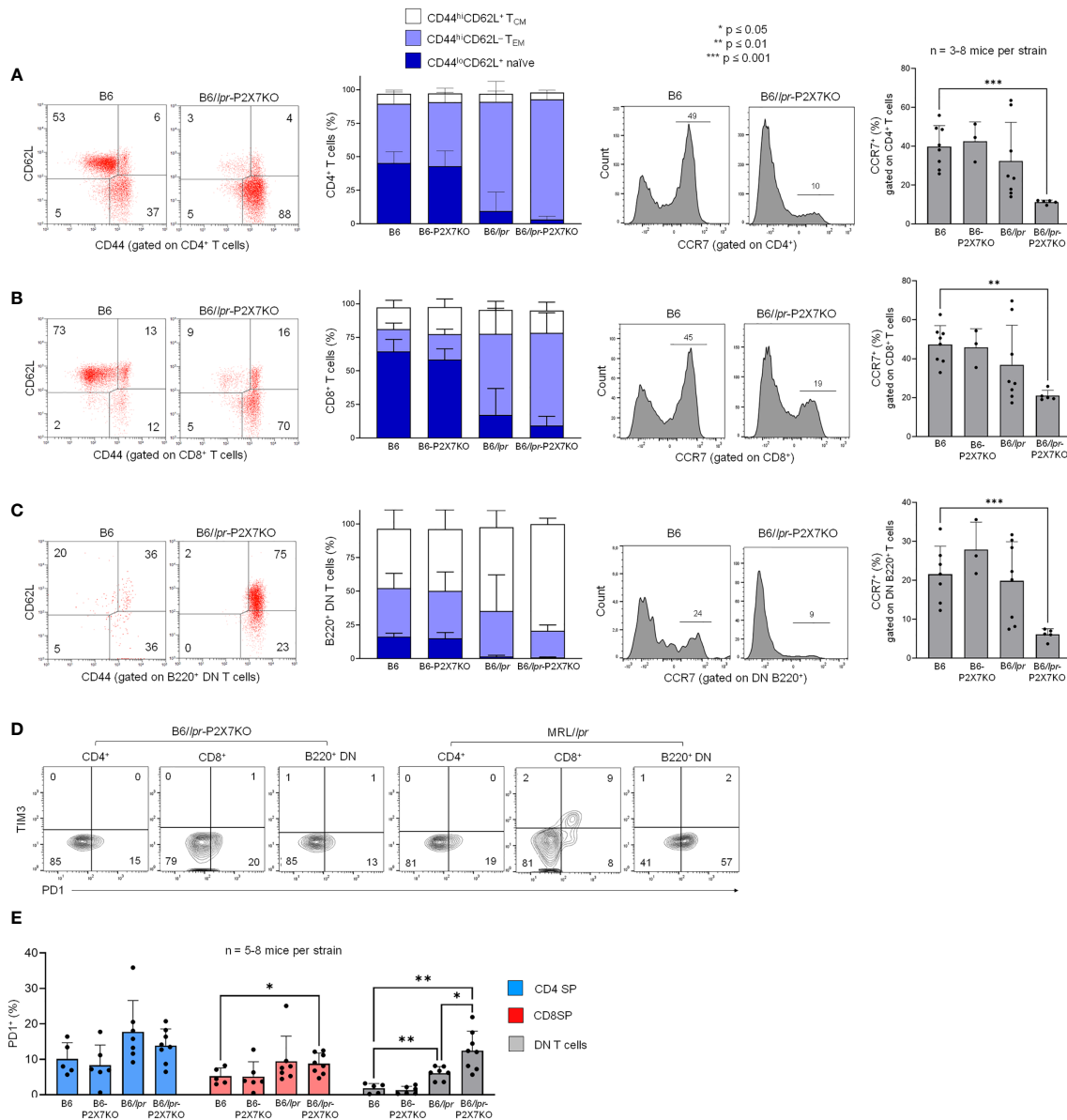


FIGURE 5

T cell subsets in *B6/lpr-p2x7KO* express predominantly central memory and effector memory phenotype but not PD-1⁺Tim-3⁺ exhausted phenotype. Spleen cells from 7- to 8-month-old female wild-type *B6*, *B6-p2x7KO*, *B6/lpr* and *B6/lpr-p2x7KO* mice (A–E) and 4-month-old female *MRL/lpr* mice (D) were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8 CD44, CD62L, CCR7, PD-1, Tim-3 or isotype controls and analyzed by flow cytometry. (A–C) Representative flow cytometry dot plots of CD44/CD62L staining. CD44 versus CD62L expression allowed to quantify the percentages of CD44^{lo}CD62L⁺ naïve (■), CD44^{hi}CD62L⁻ effector memory (■, T_{EM}) and CD44^{hi}CD62L⁺ central memory (□, T_{CM}) cells on gated CD4 SP (A), CD8 SP (B) or B220⁺ DN (C) CD90⁺ T cells from each mouse strain. Stacked bar graphs (A–C, second panel) show the respective proportions of naïve, T_{EM} and T_{CM} cells in CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ DN CD90⁺ T cells from each mouse strain. (A–C, third panel) Representative flow cytometry histograms of CCR7 staining gated on CD4 SP (A), CD8 SP (B) or B220⁺ DN (C) CD90⁺ T cells from each mouse strain. (A–C, fourth panel) Bar graphs show the mean percentage (SD, n = 3-8 mice per strain) of CCR7-expressing CD4 SP, CD8 SP and B220⁺ DN CD90⁺ T cells from each mouse strain. (D) Quantification of PD-1⁺Tim-3⁺ exhausted T cells by flow cytometry. Representative dot plots of PD-1/Tim-3 staining gated on CD4 SP, CD8 SP and B220⁺ DN CD90⁺ T cells. (E) Bar graphs show the mean percentage (SD, n = 5-8 mice per strain) of PD-1⁺ cells in gated CD4 SP (■), CD8 SP (■) or B220⁺ DN (■) CD90⁺ T cells from each mouse strains. Each dot in the bar graphs represents an individual mouse. Error bars in graphs show SD. Asterisks above horizontal lines indicate statistically significant differences assessed with unpaired two-tailed *t*-test. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

determined whether the combined mutations of *fas* and *p2x7* genes affect T cell maturation. The percentage of DN, CD4⁺CD8⁺, CD4 SP, and CD8 SP thymocyte subsets was similar in B6/*lpr-p2x7*KO and B6 mice. Similarly, DN thymocyte subsets (DN1 to DN4) defined on the basis of CD44 and CD25 expression were found in similar proportions in B6/*lpr-p2x7*KO and B6 mice (Figures S3A, C). Unexpectedly, we found a strong reduction in the percentage of IgM⁺IgD⁺ transitional B cells and a compensatory increase in the percentage of IgM⁻IgD⁻ pre-B cells (Figure S3B, D) in B6/*lpr-p2x7*KO bone marrow.

A dysregulated cytokine network and high levels of autoantibodies in B6/*lpr-p2x7*KO mice

Dysregulation of the cytokine network plays a key role in the pathogenesis of ALPS and SLE (1, 29). We therefore measured serum cytokine levels in B6/*lpr-p2x7*KO mice. Serological analyses (Figure 6) were mostly performed on the same individual mice that those used in lymphocyte immunophenotyping experiments (Figures 3, 5). Wildtype B6 and single-mutant B6-*p2x7*KO mice expressed high levels of TGF- β 1 and low levels of IL-10 and proinflammatory cytokines. By contrast, sera from B6/*lpr-p2x7*KO mice and, to a lesser extent, B6/*lpr* mice contained low levels of TGF- β 1 and high levels of IL-10. Moreover, B6/*lpr-p2x7*KO sera contained high levels of the proinflammatory cytokines IFN- γ , IL-28/IFN- λ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17A, and IL-23, of which the levels were similar or even higher (except for TNF- α) than in MRL/*lpr* sera (Figure 6A). The Table S1 presents cytokines, such as IL-12p70 or IL-18, whose levels were found higher in B6/*lpr-p2x7*KO sera than parental strains or MRL/*lpr* sera, but this trend of overexpression failed to reach statistical significance due to high inter-individual variability. We also present in this table the cytokines whose levels remained unaltered in B6/*lpr-p2x7*KO mice.

As TGF- β 1 plays a central role in the generation, expansion, and survival of Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells (Tregs), we quantified Tregs in B6/*lpr* and B6/*lpr-p2x7*KO mice. Unexpectedly, B6/*lpr-p2x7*KO mice showed significantly higher numbers of Foxp3⁺ Tregs than the parental strains (Figure S4), suggesting that Fas and P2X7 may synergistically control the pool size of Tregs in the periphery.

Anti-dsDNA autoantibodies are closely associated with manifestation of end-organ damage in patients and mouse models. RF is often associated with rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome (38). As expected, we measured pathological levels of IgG, in particular complement-fixing IgG2a, dsDNA-reactive antibodies, and RF IgG in the sera of B6/*lpr* but not B6-

*p2x7*KO mice (Figure 6B). Importantly, serum levels of IgG (Figure 6B, left panel), IgG2a, (Figure 6B, middle panel), and RF autoantibodies (Figure 6B, right panel) in B6/*lpr-p2x7*KO mice were significantly higher than in B6/*lpr* mice. Moreover, numerous studies have emphasized the central role of the cytokines BAFF, IL-6, and IL-10 in the production of autoantibodies, as well as the role of IFN- γ in isotype switching to nephritogenic complement-fixing IgG autoantibodies. Interestingly, in addition to IL-6, IL-10, and IFN- γ (see above), we found overexpression of BAFF in the sera of B6/*lpr-p2x7*KO mice (Figure 6A), suggesting that the dysregulated production of these cytokines is responsible for the expression of SLE-associated serological biomarkers in B6/*lpr-p2x7*KO mice.

Finally, to have a more global perspective of autoimmune dysregulations developed by the B6/*lpr-p2x7*KO mouse strain, cellular and serological data were normalized and presented as radar plots and heat map matrix (Figures 6C, D). Hierarchical clustering was also performed using Morpheus software (Broad institute). Importantly, while B6/*lpr-p2x7*KO and MRL/*lpr* mice were clustered together, B6-*p2x7*KO mice were clustered with normal B6 mice, highlighting the severity of the disease developed by the novel B6/*lpr-p2x7*KO mouse strain. Thus, B6/*lpr-p2x7*KO and MRL/*lpr* mice shared similar dysregulations in the proportion of the normal and pathogenic T-cell subpopulations (Figure 6D). However, at the serological level, B6/*lpr-p2x7*KO mice displayed a unique cytokine profile which combines some of the cytokine dysregulations found in B6/*lpr* and/or MRL/*lpr* mice and some found in B6/*lpr-p2x7*KO mice only (Figures 6C, D). In agreement with their mild autoimmune phenotype, B6/*lpr* mice were clustered between the normal (B6 and B6-*p2x7*KO) and the severely affected (B6/*lpr-p2x7*KO and MRL/*lpr*) group (Figure 6D).

Overall, our data reveal that combined Fas and P2X7 deficiency massively amplified the mild autoimmune phenotype of B6/*lpr* mice at both the cellular and serological levels.

Discussion

ALPS is characterized by disrupted peripheral lymphocyte homeostasis, leading to splenomegaly, lymphadenopathy, and hepatomegaly. Although ALPS is frequently due to germline mutations of the *FAS*, *FASLG*, or *CASP10* apoptosis gene, the genetic basis of the disease is unknown for a significant number of patients (1). Most ALPS patients present autoimmune cytopenia. As in SLE, certain ALPS patients with mostly unidentified genetic defects develop skin rashes, pulmonary disease, glomerulonephritis, hepatitis, and arthritis (39). SLE is a multifactorial autoimmune disease characterized by the

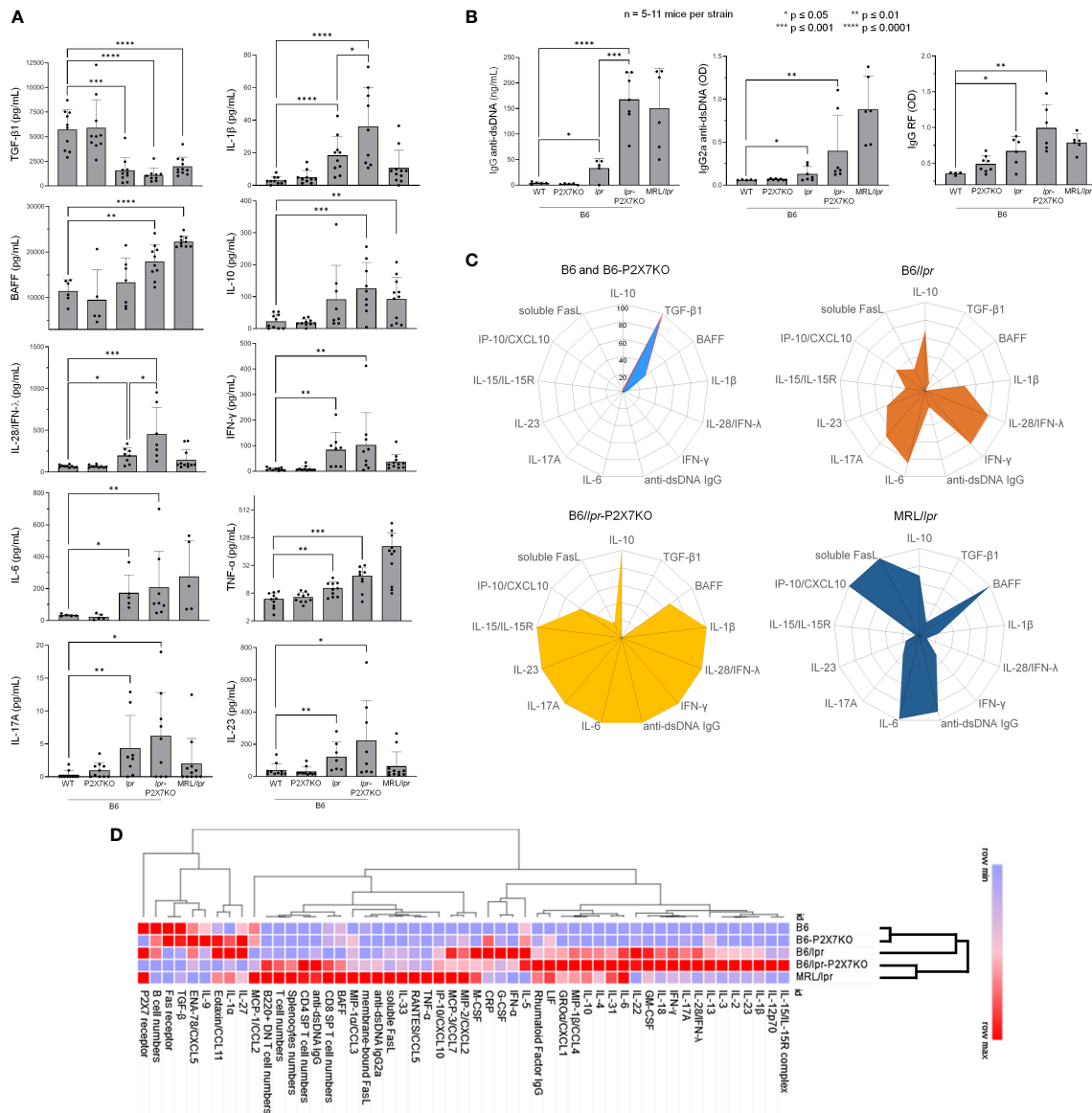


FIGURE 6

Cytokine and autoantibody levels in sera from B6/lpr-p2x7KO mice and parental strains as well as hierarchical clustering of autoimmune features. Bar graphs show serum levels of (A) the cytokines TGF-β1, IL-10, BAFF, IFN-γ, IL-28/IFN-λ, IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-17A, and IL-23, as well as (B) total IgG and IgG2a anti-dsDNA and IgG RF autoantibodies in 6- to 7-month-old female and male wildtype B6, single-mutant B6-p2x7KO, and B6/lpr mice and double-mutant B6/lpr-p2x7KO mice, as well as 4-month-old female MRL/lpr mice. Data are expressed as mean (SD) of 5-11 mice per strain, and each dot in the bar graphs represents an individual mouse. Error bars in graphs show SD. Asterisks above horizontal lines indicate statistically significant differences assessed with unpaired two-tailed *t*-test. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001 *****p* ≤ 0.0001. (C) Radar plot profiles of the cytokine and anti-dsDNA autoantibody levels in B6 and B6-p2x7KO (upper panel, left), B6/lpr (upper panel, right), B6/lpr-p2x7KO (lower panel, left), and MRL/lpr (lower panel, right) mice. Using min-max normalization, we rescaled data values of every feature between 0 and 1 via the formula $x' = (x - \min(x)) / (\max(x) - \min(x))$ where $\min(x)$ and $\max(x)$ are the minimum and the maximum values of the feature, respectively. (D) Heat map and hierarchical clustering of cellular and serological features from B6, B6-p2x7KO, B6/lpr, B6/lpr-p2x7KO, and MRL/lpr mice. For each feature, measured data were normalized (min-max normalization) and loaded in the data-processing software Morpheus (Broad Institute). The color gradient represented the lowest (blue) and highest (red) value found among the five mice strains. Hierarchical clustering was applied using one minus Pearson correlation to assess whether clinical and biological parameters from B6/lpr-p2x7KO cluster with those of B6/lpr and/or MRL/lpr mice.

hyperactivation of immune cells, the production of autoantibodies, and immune complex-mediated inflammatory damage in multiple organs. The genetic factors that contribute to predisposition to the disease and its severity consist of multiple susceptibility alleles, each with only a small individual contribution. Although MRL/*lpr* and B6/*lpr* mouse models have allowed the discovery of key mechanisms of the disease (2), additional genes of pathological importance are yet to be discovered.

The P2X7/ATP pathway plays a major role in the development of inflammatory and autoimmune diseases (14, 16). Thus, elevated P2X7 expression on Th1 and Th17 cells from SLE patients has been shown to be related to disease exacerbation (20), whereas P2X7 deletion in follicular helper T cells led to their aberrant expansion and the generation of self-reactive antibodies in pristane-induced lupus mice (25). However, we did not observe an expansion of the Bcl-6-expressing effector/memory CD4⁺ T-cell subset in B6/*lpr-p2x7KO* mice (data not shown). These previous reports, showing either a pathogenic or a protective role of P2X7 in the onset and progression of SLE, highlight the need to pursue studies on how P2X7 regulates T-cell effector functions under normal and pathological conditions. Previously, we showed that P2X7 expression and ATP-induced cellular functions in normal CD4⁺ (conventional and regulatory) and CD8⁺ T cells depend on their stage of activation and differentiation instead of P2X7 levels (26, 27). We previously showed a marked downregulation of P2X7 membrane expression and ATP sensitivity in pathogenic CD4⁺CD8⁻ T cells from MRL/*lpr* and B6/*lpr* mice (28), suggesting that P2X7 deficiency could amplify lymphoaccumulation and autoimmunity in the Fas-deficient mouse strain. Therefore, we generated double-mutant B6/*lpr-p2x7KO* mice. We chose the B6 genetic background because B6/*lpr* mice develop milder disease than MRL/*lpr* mice, making it easier to detect potential phenotypic changes. Importantly, B6/*lpr-p2x7KO* mice showed an unexpected high early death rate, indicating that they develop a rapid and/or severe form of the disease. Thus, mean survival for B6/*lpr-p2x7KO* mice was 20 weeks for both males and females versus 60 (females) to 73 (males) weeks for B6/*lpr* mice [Table 2 and (10)]. These data on mortality rates by sex suggest an absence of sexual dimorphism in B6/*lpr-p2x7KO* mice, although females showed significantly higher lymphoaccumulation than males. Lymphadenopathy and splenomegaly in B6/*lpr-p2x7KO* mice, which peaks at approximately 7 to 8 months of age, were due to the massive accumulation of FasL^{hi}B220⁺ DN T cells expressing the Eomes^{hi}CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory phenotype. Moreover, we found B220⁺ DN T cells to mostly originate from Eomes⁺ CD8⁺ T cells at the CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory stage, which display a very low sensitivity to both P2X7 (27) and Fas receptor (40). Importantly, Eomes-deficient B6/*lpr* mice show reduced B220⁺ DN T cell numbers (30), confirming

the CD8 origin of the DN subset. Moreover, B6/*lpr-p2x7KO* sera contained high levels of IFN- γ , of which the important sources of production are effector/memory CD8⁺ T cells. Overall, our data suggest that P2X7 is physiologically involved in the homeostasis of effector/memory CD8⁺ T cells in synergy with the Fas death receptor. Finally, the high levels of CD45RB on B220⁺ DN T cells from B6/*lpr-p2x7KO* mice, which is reminiscent of the human EMRA phenotype [CD44^{hi}CD45RA^{hi}CCR7⁻ (36, 37)], suggest that they are in a chronically activated state. In addition, PDI⁺Tim-3⁻ T cells were entirely absent from B6/*lpr-p2x7KO* mice, indicating that accumulating T cells do not reach an exhausted state.

Importantly, the limited lupus-like syndrome of B6/*lpr* mice was greatly amplified in B6/*lpr-p2x7KO* mice, as shown by the high levels of complement-fixing IgG2a anti-dsDNA autoantibodies (Table 2), which are major nephritogenic autoantibodies in MRL/*lpr* mice (41), and the dysregulated cytokine network. The key synergistic role of the Fas and P2X7 deficiency in the severity of lupus disease is emphasized by the low anti-dsDNA antibody levels in Bcl-3 (42) and NF- κ B2 (43) deficient B6/*lpr* mice, although they display high B220⁺ DN T-cell numbers. In B6/*lpr-p2x7KO* sera, we found high levels of IFN- γ , which is involved in isotype switching to complement-fixing IgG2a, as well as BAFF, IL-10, IL-6, and IL-17A. The latter cytokines are instrumental in driving autoantibody production in lupus through their ability to control B-cell maturation, survival, and differentiation into antibody-secreting plasma cells. Therefore, overproduced long-lived plasma cells could be involved in the decreased percentage of transitional B cells found in B6/*lpr-p2x7KO* bone marrow. IL-6 is also essential for the generation and maintenance of IL-17A-producing Th17 cells, which are involved in ALPS and SLE by protecting T cells from Fas-induced cell death (44). Indeed, lower numbers of IL-17A-producing Th17 cells in IL-23R-deficient B6/*lpr* mice resulted in reduced anti-DNA antibody levels and lupus nephritis (45). Of note, DN T cells are an important source of IL-17A in SLE patients (4) and MRL/*lpr* mice (46), and therefore most probably also in B6/*lpr-p2x7KO* mice. As in various autoimmune diseases (47), IL-15/IL-15R α complexes were found at high levels in B6/*lpr-p2x7KO* sera. Such overexpression could amplify lymphoaccumulation, as the IL-15/IL-15R α complex is an anti-apoptotic cytokine (48), in addition to its ability to regulate CD8⁺ T-cell expansion and cytotoxicity (34). Sera of B6/*lpr-p2x7KO* mice also contained high levels of the type III interferons IL-28/IFN- λ , for which the role in SLE pathogenesis has been recently highlighted (49). Importantly, B6/*lpr-p2x7KO* mice had low levels of serum TGF- β 1, which is a predisposing factor to autoimmunity, as TGF- β 1 plays a pivotal role in maintaining peripheral immune tolerance by promoting Foxp3⁺ Tregs (50). Moreover, the overexpression of IL-6 in B6/*lpr-p2x7KO* mice could further impair the generation of peripheral Foxp3⁺ Tregs, as high IL-6 levels can favor the conversion of Treg cells into pathogenic IL-17A-secreting Th17 cells (51). However, since Tregs from WT B6 mice express high levels of P2X7 membrane

expression and sensitivity to ATP (26, 27), the higher number of Tregs that we observed in B6/*lpr-p2x7*KO spleen compared to B6/*lpr* spleen is likely due to their loss of sensitivity to ATP-mediated cell death via P2X7. Our results suggest that P2X7 plays a role in the homeostasis of peripheral Foxp3⁺ Tregs by preventing their tissue accumulation through their high sensitivity to ATP-induced cell death. Besides, P2X7 could negatively regulate the activation/differentiation of Tregs by a mechanism independent of the TGF-β1 pathway that needs to be further investigated.

In summary, we show that B6/*lpr-p2x7*KO mice express key biomarkers of ALPS and severe lupus disease (1, 32, 33). Thus, B6/*lpr-p2x7*KO mice have large areas of renal tissue fibrosis, high serum levels of inflammatory cytokines, soluble FasL, anti-dsDNA autoantibodies, and RF but they did not show the severe skin lesions observed in MRL/*lpr* mice. However, the livers of B6/*lpr-p2x7*KO mice, but not MRL/*lpr* mice, showed massive T-cell infiltrates, especially B220⁺ DN T cells, suggesting that target organs/tissues differ between the two SLE models. Moreover, B6/*lpr-p2x7*KO mice showed a significantly higher percentage and/or absolute number of GzmB⁺ CD8 SP T cells and FasL⁺ B220⁺ DN T cells, which could generate tissue damage, as the *lpr* mutation is leaky. In addition, we found elevated blood levels of urea, ASAT, and LDH. Therefore, alongside invaluable models of ALPS and/or SLE, such as MRL/*lpr* mice, the B6/*lpr-p2x7*KO mouse strain is a novel model of T-cell homeostasis dysregulation and lupus development. Importantly, B6/*lpr-p2x7*KO mice exhibit a unique autoimmune profile highlighting the Fas and P2X7 synergy. Thus some autoimmune features such as renal infiltrations, IgG dsDNA autoantibodies as well as BAFF and IL-6 cytokines are shared between B6/*lpr-p2x7*KO and MRL/*lpr* mice, whereas other features such as liver infiltration and IL-1β, IL-15/IL-15R, IL-17A, IL-23, IL-28/IFN-λ are inherited from B6/*lpr* mice but with a massive amplification due to the absence of P2X7. Therefore, our present study is the first experimental demonstration that P2X7 plays a key protective role against the development of ALPS and systemic autoimmune conditions, in particular SLE. The mTOR signaling pathway, which regulates many cellular processes, could play a key role in the protective function of P2X7. Indeed, the treatment of MRL/*lpr* mice with the immunosuppressant FTY720 led to a significant decrease of the number of DN T cells (52), most likely through the activation of protein phosphatase 2A (PP2A), which negatively regulates the mTOR signaling pathway. The involvement of the mTOR kinase in the acquisition of the DN T cell phenotype is further documented by a report showing that the treatment of SLE patients with mTOR inhibitor sirolimus/rapamycin can significantly reduce IL-17-producing DN T cell numbers (53). In patients with ALPS, rapamycin treatment massively reduced lymphoproliferation and numbers of circulating DN T cells. The mTOR pathway has been identified as a major regulator of the accumulation and aberrant differentiation of Fas-deficient T cells

(54). Furthermore, the mTOR signaling pathway is activated by proinflammatory cytokines such as IL-15 (55), whereas it can be repressed by the immunosuppressive cytokine TGF-β1 (56) and after P2X7 activation (57). Therefore, we suggest that the high mTOR activity caused by the Fas deficiency in B6/*lpr* T cells could be increased still further by the loss of P2X7, therefore leading to the massive increase of lymphoaccumulation and aberrant differentiation observed in B6/*lpr-p2x7*KO mice correlated with the increase of IL-15 and the decrease of TGF-β1 levels.

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 local (CEEA03 and CEEA40) and national (MESRI) ethics committees for research (agreement number: D452346).

Author contributions

The experiments were conceived and designed by PB, AM, TH-H, and JL. JK and KB contributed critical reagent, resources, and expertise. Experiments were performed by AM, TH-H, JL, MB, HS, and FM-N. The data were processed and analyzed by AM, PB, TH-H, JL, and FM-N and supervised by PB. The manuscript was written by PB and AM and critically reviewed by all authors. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was funded by grants from the ANR – Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-ISV6-0003). HS was the recipient of a National Council for Scientific Research (CNRS) Lebanon fellowship.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr H el ene Le Buanec (INSERM U976, Paris) for giving us access to her BioPlex MAGPIX multiplex reader instrument. Article processing charges have been paid by UMR-996 INSERM – Paris-Saclay University, Team I" Immunoregulation, Chemokines and Viral Persistence".

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.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.957008/full#supplementary-material>

References

- Molnar E, Radwan N, Kovacs G, Andrikovics H, Henriquez F, Zarafon A, et al. Key diagnostic markers for autoimmune lymphoproliferative syndrome with molecular genetic diagnosis. *Blood* (2020) 136(17):1933–45. doi: 10.1182/blood.2020005486
- Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J BioMed Biotechnol* (2011) 2011:271694. doi: 10.1155/2011/271694
- Rodriguez-Rodriguez N, Apostolidis SA, Fitzgerald L, Meehan BS, Corbett AJ, Martin-Villa JM, et al. Pro-inflammatory self-reactive t cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells. *Eur J Immunol* (2016) 46(6):1383–91. doi: 10.1002/eji.201546056
- Li H, Adamopoulos IE, Moulton VR, Stillman IE, Herbert Z, Moon JJ, et al. Systemic lupus erythematosus favors the generation of IL-17 producing double negative T cells. *Nat Commun* (2020) 11(1):2859. doi: 10.1038/s41467-020-16636-4
- Hao Z, Duncan GS, Seagal J, Su YW, Hong C, Haight J, et al. Fas receptor expression in germinal-center b cells is essential for T and b lymphocyte homeostasis. *Immunity* (2008) 29(4):615–27. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.016
- Benihoud K, Bonardelle D, Bobé P, Kiger N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol* (1997) 27(2):415–20. doi: 10.1002/eji.1830270211
- Bonardelle D, Benihoud K, Kiger N, Bobé P. B lymphocytes mediate fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J Leukoc Biol* (2005) 78(5):1052–9. doi: 10.1189/jlb.0904536
- Bobé P, Bonardelle D, Reynes M, Godeau F, Mahiou J, Joulin V, et al. Fas-mediated liver damage in MRL hemopoietic chimeras undergoing lpr-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol* (1997) 159(9):4197–204.
- Bonardelle D, Bobé P, Reynes M, Amouroux J, Tricottet V, Godeau F, et al. Inflammatory arthropathy in MRL hematopoietic chimeras undergoing fas mediated graft-versus-host syndrome. *J Rheumatol* (2001) 28(5):956–61.
- Izui S, Kelley VE, Masuda K, Yoshida H, Roths JB, Murphy ED. Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice. *J Immunol* (1984) 133(1):227–33.
- Benihoud K, Bonardelle D, Soual-Hoebeke E, Durand-Gasselini I, Emilie D, Kiger N, et al. Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain. *Oncogene* (2002) 21(36):5593–600. doi: 10.1038/sj.onc.1205730
- Elliott JI, McVey JH, Higgins CF. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: A hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis Res Ther* (2005) 7(3):R468–75. doi: 10.1186/ar1699
- Portales-Cervantes L, Nino-Moreno P, Doniz-Padilla L, Baranda-Candido L, Garcia-Hernandez M, Salgado-Bustamante M, et al. Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* (2010) 71(8):818–25. doi: 10.1016/j.humimm.2010.05.008
- Giuliani AL, Sarti AC, Falzoni S, Di Virgilio F. The P2X7 receptor-Interleukin-1 liaison. *Front Pharmacol* (2017) 8:123. doi: 10.3389/fphar.2017.00123
- Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, et al. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, l-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* (2009) 20(6):1785–94. doi: 10.1091/mbc.e08-11-1135
- Kopp R, Krautloher A, Ramirez-Fernandez A, Nicke A. p2x7 interactions and signaling - making head or tail of it. *Front Mol Neurosci* (2019) 12:183. doi: 10.3389/fnmol.2019.00183
- Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* (2008) 455(7214):808–12. doi: 10.1038/nature07240
- Schenk U, Frascoli M, Proietti M, Geffers R, Traggiai E, Buer J, et al. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* (2011) 4(162):ra12. doi: 10.1126/scisignal.2001270
- Purvis HA, Anderson AE, Young DA, Isaacs JD, Hilkens CM. A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *J Immunol* (2014) 193(3):1142–50. doi: 10.4049/jimmunol.1302467
- Li M, Yang C, Wang Y, Song W, Jia L, Peng X, et al. The expression of P2X7 receptor on Th1, Th17, and regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis and its correlations with active disease. *J Immunol* (2020) 205(7):1752–62. doi: 10.4049/jimmunol.2000222
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* (2002) 168(12):6436–45. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6436
- Chen L, Brosnan CF. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in p2x7R-/- mice: Evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* (2006) 176(5):3115–26. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3115
- Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, et al. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* (2012) 3:1034. doi: 10.1038/ncomms2023
- Zhao J, Wang H, Dai C, Zhang H, Huang Y, Wang S, et al. p2x7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/caspase 1 pathway. *Arthritis Rheumatol* (2013) 65(12):3176–85. doi: 10.1002/art.38174
- Faliti CE, Gualtierotti R, Rottoli E, Gerosa M, Perruzza L, Romagnani A, et al. p2x7 receptor restrains pathogenic thf cell generation in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* (2019) 216(2):317–36. doi: 10.1084/jem.20171976
- Safya H, Mellouk A, Legrand J, Le Gall SM, Benbijja M, Kanellopoulos-Langevin C, et al. Variations in cellular responses of mouse T cells to adenosine-5'-Triphosphate stimulation do not depend on P2X7 receptor expression levels but on their activation and differentiation stage. *Front Immunol* (2018) 9:360. doi: 10.3389/fimmu.2018.00360
- Mellouk A, Bobé P. CD8(+), but not CD4(+) effector/memory T cells, express the CD44(high)CD45RB(high) phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses. *FASEB J* (2019) 33(3):3225–36. doi: 10.1096/fj.201800867R
- Le Gall SM, Legrand J, Benbijja M, Safya H, Benihoud K, Kanellopoulos JM, et al. Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* (2012) 7(12):e52161. doi: 10.1371/journal.pone.0052161
- Bobé P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MK. Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* (2006) 108(13):3967–75. doi: 10.1182/blood-2006-04-020610

30. Kinjyo I, Gordon SM, Intlekofer AM, Dowdell K, Mooney EC, Caricchio R, et al. Cutting edge: Lymphoproliferation caused by fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin. *J Immunol* (2010) 185(12):7151–5. doi: 10.4049/jimmunol.1003193
31. Qui HZ, Hagymasi AT, Bandyopadhyay S, St Rose MC, Ramanarasimhaiah R, Menoret A, et al. CD134 plus CD137 dual costimulation induces eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation. *J Immunol* (2011) 187(7):3555–64. doi: 10.4049/jimmunol.1101244
32. Bride K, Teachey D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: More than a FAScinating disease. *F1000Res* (2017) 6:1928. doi: 10.12688/f1000research.11545.1
33. Le Gallo M, Poissonnier A, Blanco P, Legembre P. CD95/Fas, non-apoptotic signaling pathways, and kinases. *Front Immunol* (2017) 8:1216. doi: 10.3389/fimmu.2017.01216
34. Nolz JC, Richer MJ. Control of memory CD8(+) T cell longevity and effector functions by IL-15. *Mol Immunol* (2020) 117:180–8. doi: 10.1016/j.molimm.2019.11.011
35. Zumwalt TJ, Arnold M, Goel A, Boland CR. Active secretion of CXCL10 and CCL5 from colorectal cancer microenvironments associates with GranzymeB+ CD8+ T-cell infiltration. *Oncotarget* (2015) 6(5):2981–91. doi: 10.18632/oncotarget.3205
36. D'Asaro M, Dieli F, Caccamo N, Musso M, Porretto F, Salerno A. Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (TEMRA) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* (2006) 20(3):545–7. doi: 10.1038/sj.leu.2404079
37. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* (2007) 178(7):4112–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4112
38. Jacob N, Stohl W. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for b cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity* (2010) 43(1):84–97. doi: 10.3109/08916930903374600
39. Teachey DT, Seif AE, Grupp SA. Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Br J Haematol* (2010) 148(2):205–16. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07991.x
40. Tinhofer I, Marschitz I, Kos M, Henn T, Egle A, Villunger A, et al. Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in b chronic lymphocytic leukemia. *Blood* (1998) 91(11):4273–81. doi: 10.1182/blood.V91.11.4273
41. Peng SL, Moslehi J, Craft J. Roles of interferon-gamma and interleukin-4 in murine lupus. *J Clin Invest*. (1997) 99(8):1936–46. doi: 10.1172/JCI119361
42. Tang W, Wang H, Tian R, Saret S, Cheon H, Claudio E, et al. Bcl-3 inhibits lupus-like phenotypes in BL6/lpr mice. *Eur J Immunol* (2020) 51(1):197–205. doi: 10.1002/eji.202048584
43. Low JT, Hughes P, Lin A, Siebenlist U, Jain R, Yaprianto K, et al. Impact of loss of NF-kappaB1, NF-kappaB2 or c-REL on SLE-like autoimmune disease and lymphadenopathy in fas(lpr/lpr) mutant mice. *Immunol Cell Biol* (2016) 94(1):66–78. doi: 10.1038/icb.2015.66
44. Boggio E, Clemente N, Mondino A, Cappellano G, Orilieri E, Gigliotti CL, et al. IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes. *Blood* (2014) 123(8):1178–86. doi: 10.1182/blood-2013-07-518167
45. Kytтарыс VC, Zhang Z, Kuchroo VK, Oukka M, Tsokos GC. Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *J Immunol* (2010) 184(9):4605–9. doi: 10.4049/jimmunol.0903595
46. Zhang Z, Kytтарыс VC, Tsokos GC. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J Immunol* (2009) 183(5):3160–9. doi: 10.4049/jimmunol.0900385
47. Waldmann TA, Miljkovic MD, Conlon KC. Interleukin-15 (dys)regulation of lymphoid homeostasis: Implications for therapy of autoimmunity and cancer. *J Exp Med* (2020) 217(1):e20191062. doi: 10.1084/jem.20191062
48. Inoue S, Unsinger J, Davis CG, Muenzer JT, Ferguson TA, Chang K, et al. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J Immunol* (2010) 184(3):1401–9. doi: 10.4049/jimmunol.0902307
49. Goel RR, Wang X, O'Neil LJ, Nakabo S, Hasneen K, Gupta S, et al. Interferon lambda promotes immune dysregulation and tissue inflammation in TLR7-induced lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2020) 117(10):5409–19. doi: 10.1073/pnas.1916897117
50. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the immune response by TGF- β : From conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2017) 9(6). doi: 10.1101/cshperspect.a022236
51. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol* (2017) 18(6):612–21. doi: 10.1038/ni.3742
52. Okazaki H, Hirata D, Kamimura T, Sato H, Iwamoto M, Yoshio T, et al. Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice: Therapeutic potential in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (2002) 29(4):707–16.
53. Lai ZW, Kelly R, Winans T, Marchena I, Shadakshari A, Yu J, et al. Sirolimus in patients with clinically active systemic lupus erythematosus resistant to, or intolerant of, conventional medications: A single-arm, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* (2018) 391(10126):1186–96. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30485-9
54. Volk S, Rensing-Ehl A, Allgauer A, Schreiner E, Lorenz MR, Rohr J, et al. Hyperactive mTOR pathway promotes lymphoproliferation and abnormal differentiation in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* (2016) 128(2):227–38. doi: 10.1182/blood-2015-11-685024
55. Mao Y, van Hoef V, Zhang X, Wennerberg E, Lorent J, Witt K, et al. IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood* (2016) 128(11):1475–89. doi: 10.1182/blood-2016-02-698027
56. Gabriel SS, Tsui C, Chisanga D, Weber F, Llano-Leon M, Gubser PM, et al. Transforming growth factor-beta-regulated mTOR activity preserves cellular metabolism to maintain long-term T cell responses in chronic infection. *Immunity* (2021) 54(8):1698–1714 e5. doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.007
57. Bian S, Sun X, Bai A, Zhang C, Li L, Enjyoji K, et al. p2x7 integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR signaling pathways to mediate tumor cell death. *PLoS One* (2013) 8(4):e60184. doi: 10.1371/journal.pone.0060184

V. Hypercholesterolemia negatively regulate P2X7-induced cellular function in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from B6 mice fed a high-fat diet


Tom Hutteau-Hamel, Amine Mellouk, Nicolas Trainel, Anne-Marie Cassard, Pierre Bobé

Nous avons précédemment montré que le cholestérol de la membrane plasmique et le taux en gangliosides GM1 sont responsables de la sensibilité opposée des lignées tumorales lymphocytaires T de souris à l'ATP. Nous avons également rapporté que la sensibilité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ à l'ATP dépend de leur stade de différenciation. Ici, nous montrons que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ de souris B6 expriment différents niveaux de GM1 et P2X7 membranaires mais des niveaux similaires de cholestérol. Ainsi, dans les lymphocytes T CD4⁺, le taux en cholestérol membranaire était négativement corrélé au clivage de CD62L induit par l'ATP, mais positivement corrélée à la formation de pores, à l'externalisation de la phosphatidylsérine et à la mort cellulaire. En revanche, dans les lymphocytes T CD8⁺, les taux de cholestérol, de GM1 et de P2X7 sont corrélés négativement avec toutes ces réponses cellulaires induites par la voie ATP/P2X7. La relation entre le cholestérol et les réponses cellulaires induites par P2X7 a été confirmée en modulant les taux de cholestérol soit *ex vivo*, soit par le biais d'un régime riche en lipides et supplémenté en cholestérol. L'enrichissement de la membrane en cholestérol *ex vivo* a entraîné une réduction significative de toutes les réponses cellulaires induites par P2X7 dans les lymphocytes T. De plus, de façon importante, l'hypercholestérolémie induite par l'alimentation chez les souris B6 était également associée à une diminution de la sensibilité à l'ATP dans les cellules T CD4⁺ et CD8⁺, mettant en évidence la relation entre l'apport en cholestérol et les amplitudes des réponses cellulaires induites par P2X7 dans les lymphocytes T.



Article

Hypercholesterolemia Negatively Regulates P2X7-Induced Cellular Function in CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Subsets from B6 Mice Fed a High-Fat Diet

Tom Hutteau-Hamel, Amine Mellouk, Nicolas Trainel, Anne-Marie Cassard  and Pierre Bobé *

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale—INSERM, Université Paris-Saclay, UMR 996, 92140 Clamart, France; tom.hutteau@universite-paris-saclay.fr (T.H.-H.); amine.mellouk@universite-paris-saclay.fr (A.M.); nicolas.trainel@universite-paris-saclay.fr (N.T.); cassard.doulcier@universite-paris-saclay.fr (A.-M.C.)

* Correspondence: pierre.bobe@universite-paris-saclay.fr; Tel.: +33-1-4128-8003; Fax: +33-1-4632-7993

Abstract: We have previously showed that plasma membrane cholesterol and GM1 ganglioside content are responsible for the opposite sensitivity of mouse leukemic T cells to ATP. We also reported that the sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to ATP depends on their stage of differentiation. Here, we show that CD4⁺ and CD8⁺ T cells from B6 mice express different levels of membrane GM1 and P2X7 but similar levels of cholesterol. Thus, in CD4⁺ T cells, membrane cholesterol content negatively correlated with ATP/P2X7-induced CD62L shedding but positively correlated with pore formation, phosphatidylserine externalization, and cell death. By contrast, in CD8⁺ T cells, cholesterol, GM1, and P2X7 levels negatively correlated with all these ATP/P2X7-induced cellular responses. The relationship between cholesterol and P2X7-induced cellular responses was confirmed by modulating cholesterol levels either ex vivo or through a high-fat diet. Membrane cholesterol enrichment ex vivo led to a significant reduction in all P2X7-induced cellular responses in T cells. Importantly, diet-induced hypercholesterolemia in B6 mice was also associated with decreased sensitivity to ATP in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, highlighting the relationship between cholesterol intake and the amplitudes of P2X7-induced cellular responses in T cells.

Keywords: cholesterol; high fat diet; P2X7 receptor; T-cell subsets



Citation: Hutteau-Hamel, T.; Mellouk, A.; Trainel, N.; Cassard, A.-M.; Bobé, P. Hypercholesterolemia Negatively Regulates P2X7-Induced Cellular Function in CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Subsets from B6 Mice Fed a High-Fat Diet. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6730. <https://doi.org/10.3390/ijms23126730>

Academic Editor: Ronald Sluyter

Received: 17 May 2022

Accepted: 15 June 2022

Published: 16 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The P2X purinergic receptor 7 (P2X7) is an ATP-gated cation channel that can trigger numerous cellular and physiologic functions [1]. The types and amplitudes of P2X7-induced cellular responses depend on the duration of stimulation by ≥ 150 μ M of extracellular ATP (eATP) in its tetraanionic form [2]. Short-term stimulation of P2X7 induces the opening of ion channels [3] and phosphatidylserine (PS) externalization to the outer leaflet of the plasma membrane [4]. Long-term stimulation of P2X7 results in the formation of non-selective membrane pores, allowing entry of molecules with molecular masses of up to 900 Da [5,6]. Continuous stimulation with eATP can lead to cell death by apoptosis [7,8] or necrosis [9], depending on the cell type. In contrast, P2X7 activation may trigger an antiapoptotic or mitogenic activity [10–12].

P2X7 plays a major role in various immune processes, such as the maturation of proinflammatory cytokines [13], the proteolytic cleavage of transmembrane protein such as CD62L and TNF α [14,15], and the activation of T cells [15]. We previously showed that the regulation of the sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to eATP depends on their stage of activation and differentiation [16,17]. Moreover, we found that pathogenic B220⁺ CD4⁻ CD8⁻ (DN) T cells that accumulate in lupus MRL/*lpr* and B6/*lpr* mice exhibit a large reduction in P2X7 membrane expression and sensitivity to eATP [18]. The reduced sensitivity of pathogenic B220⁺ DN T cells, but not normal B220⁻ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺), to

eATP could be due to the expression of a negative regulator of P2X7 that is still undefined. Importantly, approximately 75% of the MRL genome is derived from the LG/J mouse strain, which is characterized by large body size, rapid growth, elevated body weight, and high susceptibility to diet-induced obesity and atherosclerosis (<https://www.jax.org/strain/000486>, accessed on 4 May 2022). Therefore, we suggest that metabolic dysregulation could lead to reduced sensitivity of P2X7 to eATP. Indeed, lipid environment through its influence on the plasma membrane composition is known to affect P2X7 functionality [1]. Membrane cholesterol plays a critical role in regulating the activity of P2X7, which contains several putative cholesterol recognition amino acid consensus motifs within its N-terminal and proximal C-terminal regions [1]. The association of P2X7 with cholesterol-enriched microdomains/lipid rafts of the plasma membrane has been reported in different cell types [19]. The trafficking of P2X7 into lipid rafts seems to require caveolin-1 interaction or palmitoylation, depending on the cell type [20,21]. Palmitoylation of the cytoplasmic cysteine-rich region at the end of the second transmembrane domain is also involved in the lack of desensitization of P2X7 after eATP binding [22] and pore formation [23]. Moreover, phosphatidylglycerol and sphingomyelin were found to facilitate P2X7 pore formation [23]. In contrast, membrane cholesterol negatively regulates P2X7-mediated pore formation and cell death [24]. However, the impact of membrane cholesterol content on eATP-induced cellular functions had been extensively evaluated in P2X7-transfected fibroblast or HEK 293 cells and noticeably less in T cells.

The physiological and pathological importance of cholesterol metabolism in T-cell immunity has been widely demonstrated [25]. For example, the immunological synapse formed between a T cell and an antigen-presenting cell results from the aggregation of lipid rafts [26], plasma membrane microdomains enriched in cholesterol that dissipate when membrane cholesterol is depleted [27–30]. We recently showed that membrane cholesterol levels have a strong impact on cellular responses induced by the stimulation of eATP-gated P2X7 in T cells. Indeed, the modulation of membrane cholesterol level (either positively or negatively) profoundly altered the functionality of the P2X7 receptor expressed by the mouse leukemic EL4 and L1210 T-cell lines, which were either sensitive or resistant to eATP in the basal state. Thus, we were able to restore the ability of eATP to induce the opening of calcium ion channels and the formation of non-selective pores in L1210 T cells by reducing their membrane cholesterol level using methyl- β -cyclodextrin (MBCD). Conversely, we were able to inhibit the ability of EL4 cells to open calcium ion channels and form non-selective pores following stimulation with eATP by increasing the levels of membrane cholesterol using MBCD/cholesterol (MBCD/Chol) complexes [29]. In the present study, we extended these findings to CD4⁺ and CD8⁺ T cells from B6 mice. In accordance with our data obtained in leukemic T-cell lines, CD4⁺ and CD8⁺ normal T cells displayed a significantly reduced ability to form non-selective P2X7 pores and shed CD62L molecules when their levels of plasma membrane cholesterol were increased *ex vivo*. Moreover, we assessed the outcome of a high-fat/cholesterol (HFC) diet-induced hypercholesterolemia on the plasma membrane cholesterol content and the functionality of P2X7 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Importantly, in B6 mice fed the HFC diet, the high levels of circulating cholesterol were associated with decreased sensitivity to eATP in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, highlighting for the first time a relationship between cholesterol intake and P2X7 functionality in T cells. We also show herein that pore formation and CD62L shedding are not similarly affected by plasma membrane cholesterol. Indeed, pore formation followed a dose-dependent effect, whereas CD62L shedding was highly sensitive to cholesterol modulation, indicating that P2X7-mediated cellular responses are not regulated in an all-or-none manner by plasma membrane cholesterol content.

2. Results

2.1. Plasma Membrane Levels of Cholesterol and GM1 Gangliosides in T Cells at Different Stages of Differentiation and the Consequences on Their Sensitivity to eATP

As we previously reported [16,17], the sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from B6 mice to eATP depends more on their stage of differentiation than the levels of P2X7 plasma membrane expression (Figure A1). Indeed, we showed that CD44^{low}CD45RB^{high} naïve T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) efficiently shed their homing CD62L molecules and form non-selective P2X7 pores, whereas CD44^{high}CD45RB^{low} and CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) were unable to shed CD62L and, to a lesser extent, form non-selective P2X7 pores, although they express higher levels of P2X7 (Figure A1). Similarly, we recently showed that the EL4 and L1210 leukemic T cell lines display similar high levels of P2X7 membrane expression but an opposite ability to trigger channel opening, pore formation, and phosphatidylserine exposure upon eATP stimulation. Importantly, we have observed that cholesterol and GM1 gangliosides levels at the plasma membrane play a central role in the sensitivity of EL4 and L1210 T cells to eATP [29]. The well-known role of cholesterol and GM1 gangliosides in the formation, maintenance, and aggregation of lipid rafts [31,32] prompted us to evaluate the levels of plasma membrane cholesterol and GM1 in naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from B6 mice (Figure 1). In addition, we performed correlation analyses to gain insights into the respective roles of GM1 and cholesterol plasma membrane levels, as well as that of P2X7 membrane expression, in the sensitivity of naïve and effector/memory T-cell subsets (either CD4⁺ or CD8⁺) to eATP stimulation (Figure 2).

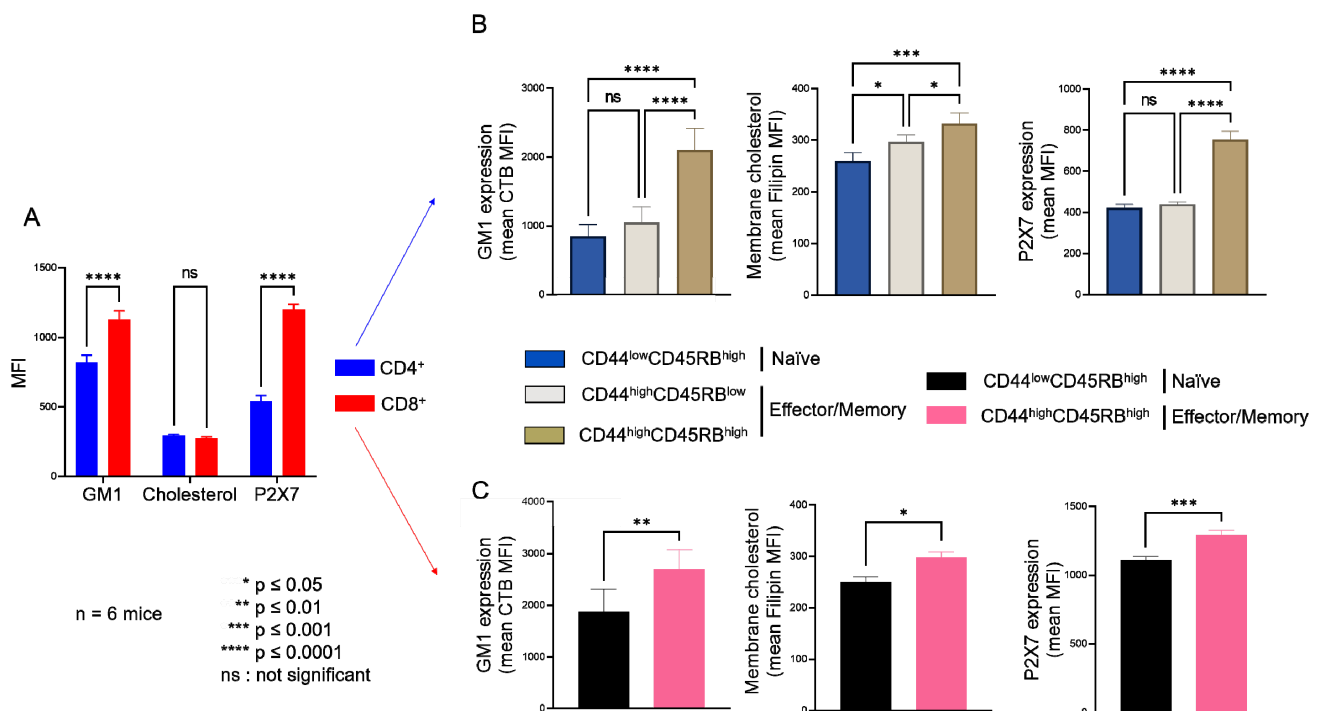


Figure 1. Plasma membrane levels of GM1 gangliosides, cholesterol and P2X7 receptor in T cells at different stages of differentiation. Plasma membrane levels of GM1, cholesterol, and P2X7 were quantified by flow cytometry using FITC-conjugated cholera toxin B subunit (CTB), filipin III, and anti-P2X7 extracellular domain mAb, respectively. Results are presented as the mean MFI values for GM1, cholesterol, and P2X7 in the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations (A) and in CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} or CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ (B) and CD8⁺ (C) T-cell subsets. Data are expressed as the mean of percentages (\pm SEM, $n \geq 6$ mice). Asterisks denote statistically significant differences * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$; ns: not significant.

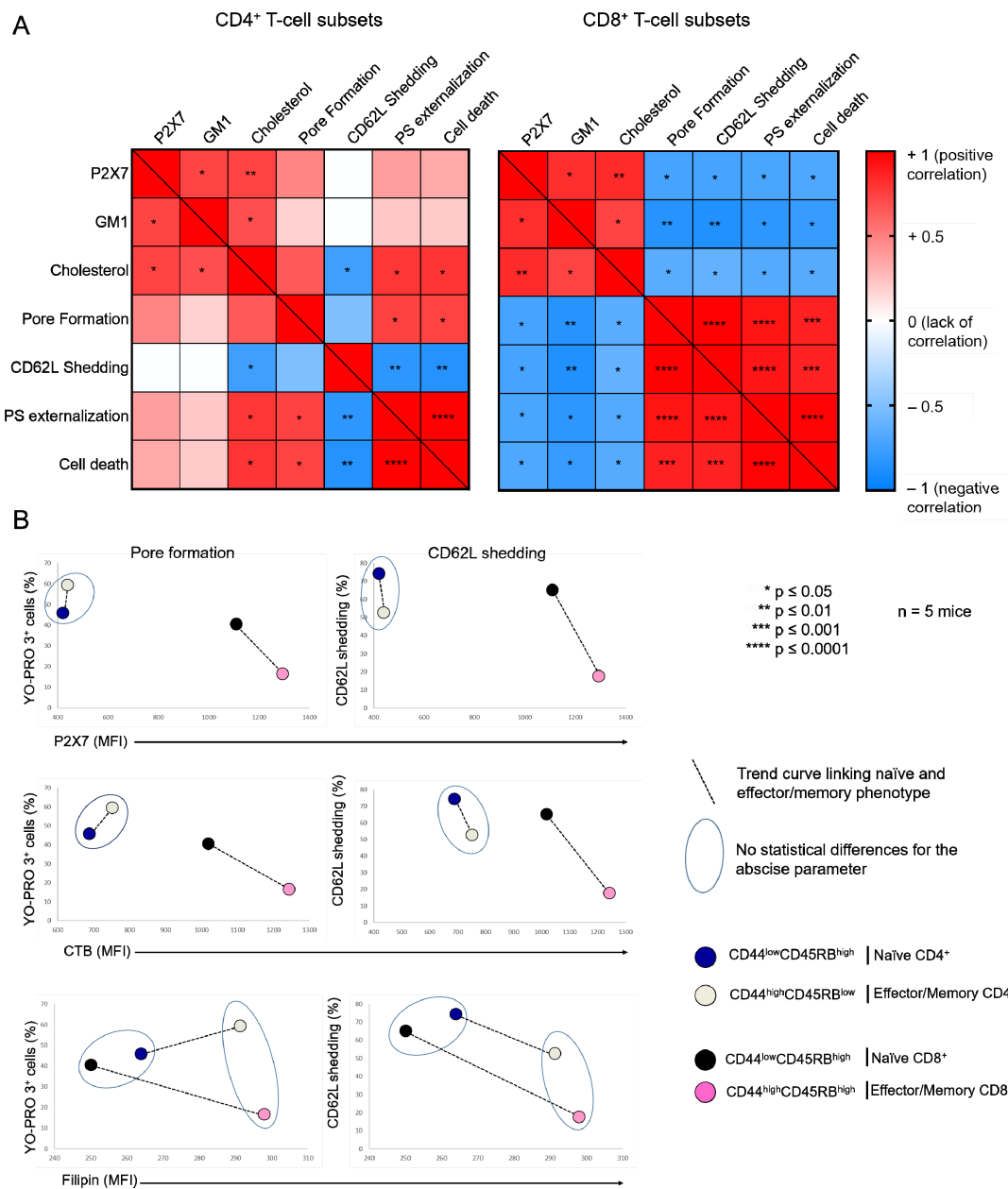


Figure 2. Relationship between the plasma membrane levels of GM1, cholesterol, and P2X7, and cellular responses induced by eATP in T-cell subsets. (A) Pearson correlation matrix showing the degree of correlation between the plasma membrane levels of GM1, cholesterol, and P2X7, pore formation, CD62L shedding, PS externalization and cell death in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations in the presence of 500 μ M ATP for 30 min at 37 °C. The magnitude and direction of the correlation coefficient is indicated on a color gradient that varies from +1 (positive correlation) to -1 (negative correlation). White squares indicate the absence of a correlation. Red and blue squares represent positive and negative correlations between two variables, respectively. Statistically significant correlations are denoted by asterisks within squares: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. (B) Scatter plots showing the phenotypic profile of CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} or CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory T-cell subsets (either CD4⁺ or CD8⁺) in terms of the amplitude of ATP-induced pore formation and CD62L shedding (500 μ M, 30 min, 37 °C) and the plasma membrane levels of GM1, cholesterol, and P2X7. The T-cell subsets that were non-statistically different for the abscissa parameter (either GM1, cholesterol, or P2X7 expression) are surrounded by a blue ellipse. The black dotted line links the naïve subset (either CD4⁺ or CD8⁺) with its effector/memory counterpart. Data are expressed as the mean of percentages (n \geq 5 mice).

Thus, flow cytometry analyses of filipin staining showed CD4⁺ and CD8⁺ T cells to display similar levels of plasma membrane cholesterol, whereas significantly higher levels of GM1 (FITC-CTB labelling) and P2X7 were expressed by CD8⁺ than CD4⁺ T cells (Figure 1A). Among CD4⁺ T-cell subsets, the CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} effector/memory subsets showed lower levels of plasma membrane GM1, cholesterol, and P2X7 than the very minor (3.45% ± 0.57) CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory subset (Figure 1B). Similarly, among CD8⁺ T cells, the CD44^{low}CD45RB^{high} naïve subset showed lower levels of plasma membrane GM1, cholesterol, and P2X7 than the CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory subset (Figure 1C). As the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets displayed significantly different sensitivity to P2X7-induced cellular responses (Figure A1), we investigated a possible relationship between phenotypic (cholesterol, GM1, and P2X7 membrane levels) and functional P2X7 characteristics (pore formation, CD62L shedding, PS externalization, cell death) in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations by creating a matrix showing the correlation coefficient between these variables (Figure 2). For CD8⁺ T cells, the phenotypic characteristics positively correlated with each other but negatively correlated with functional P2X7 characteristics. Moreover, all P2X7-induced cellular responses positively correlated with each other, suggesting that they are regulated in a similar manner in CD8⁺ T cells (Figure 2A). Interestingly, for the CD4⁺ T-cell subpopulation, P2X7-induced cellular responses correlated with plasma membrane cholesterol content only. Moreover, cholesterol content negatively affected CD62L shedding but positively affected pore formation, PS externalization, and cell death (Figure 2A). Therefore, our data suggest that P2X7-induced cellular function are regulated differently in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We generated scatter plots comparing the levels of pore formation or CD62L shedding according to P2X7, GM1, or cholesterol plasma membrane content (Figure 2B) to obtain insights into the relationship between the functional and phenotypic characteristics expressed by the various CD4⁺ and CD8⁺ T-cells subsets (either naïve or effector/memory). In accordance with the correlation matrix analyses, the sensitivity of the CD8⁺ T-cell subsets to eATP negatively correlated with all phenotypic parameters. Indeed, CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD8⁺ T cells, which showed higher levels of plasma membrane P2X7, GM1, and cholesterol than their CD44^{low}CD45RB^{high} naïve counterpart, displayed the lowest capacity to form pore and shed CD62L. By contrast, CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} effector/memory CD4⁺ T cells, although displaying similar levels of P2X7 and GM1, expressed P2X7-induced cellular responses of significantly different amplitude. Indeed, CD62L shedding was significantly more efficient than pore formation in naïve CD4⁺ T cells than in their effector/memory counterpart. Our data suggest a limited influence of P2X7 and GM1 levels on P2X7-induced cellular responses in CD4⁺ T cells. Surprisingly, the levels of plasma membrane cholesterol were similarly low in naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells and high in their effector/memory counterpart (Figure 2B). Moreover, although an increase in cholesterol content was associated with a decrease in both pore formation and CD62L shedding in CD8⁺ T cells, it was associated with an increase in pore formation and a decrease in CD62L shedding in CD4⁺ T cells. Altogether, our data suggest that cholesterol content plays a key role in the amplitude of P2X7-induced cellular responses in T-cells.

2.2. Amplitude of P2X7-Induced Cellular Responses in T Cells Following Plasma Membrane Cholesterol Modulation

We next wished to confirm the involvement of cholesterol in the amplitude of P2X7-induced cellular responses in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We thus modulated their plasma membrane cholesterol content *ex vivo* by MBCD and MBCD/Chol treatment and *in vivo* by HFC diet. When we treated spleen cells with 5 mM MBCD for 20 min at 37 °C, more than 90% of both naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells were still viable after treatment. Unexpectedly, cholesterol depletion from the plasma membrane of splenocytes had no significant effect on the sensitivity of T cells to eATP, regardless of the stage of differentiation (naïve, effector/memory) of the CD4⁺ and CD8⁺ T cells

(Figure A2). By contrast, increasing plasma membrane cholesterol levels in splenocytes from B6 mice using MBCD/Chol complexes resulted in a strong reduction in the capacity of both naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells to form the P2X7-mediated pores in response to stimulation with 500 μM eATP (Figure 3). Moreover, naïve T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) showed a greater level of reduction in P2X7-mediated pore formation than their CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory counterparts following MBCD/Chol treatment (Figure 3A). Importantly, MBCD/Chol treatment also altered the ability of naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells to shed CD62L molecules in response to 500 μM eATP (Figure 3B). Finally, effector/memory CD4⁺ T cells, known to be much more responsive to eATP-induced cell death than CD8⁺ and naïve CD4⁺ T cells, displayed a significantly reduced sensitivity to cell death following plasma membrane cholesterol enrichment (Figure 3C). ATP-induced cellular responses could be prevented by the P2X7 inhibitor A438079 (Figure 3), confirming the specificity of pore formation, CD62L shedding, and cell death. Altogether, our findings confirm that plasma membrane cholesterol levels are a key factor in modulating the amplitude of P2X7-induced cellular function in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (either naïve or effector/memory).

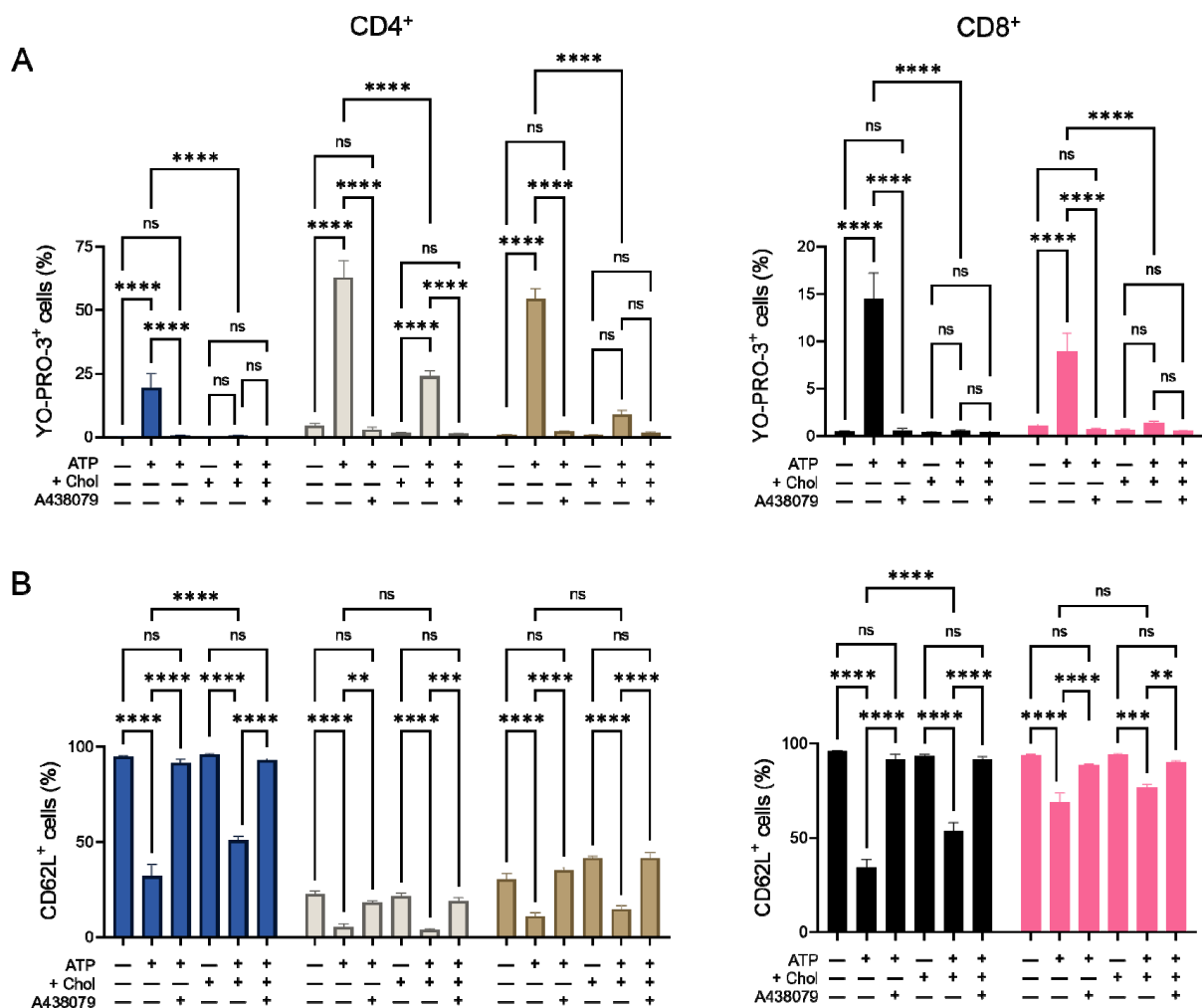


Figure 3. Cont.

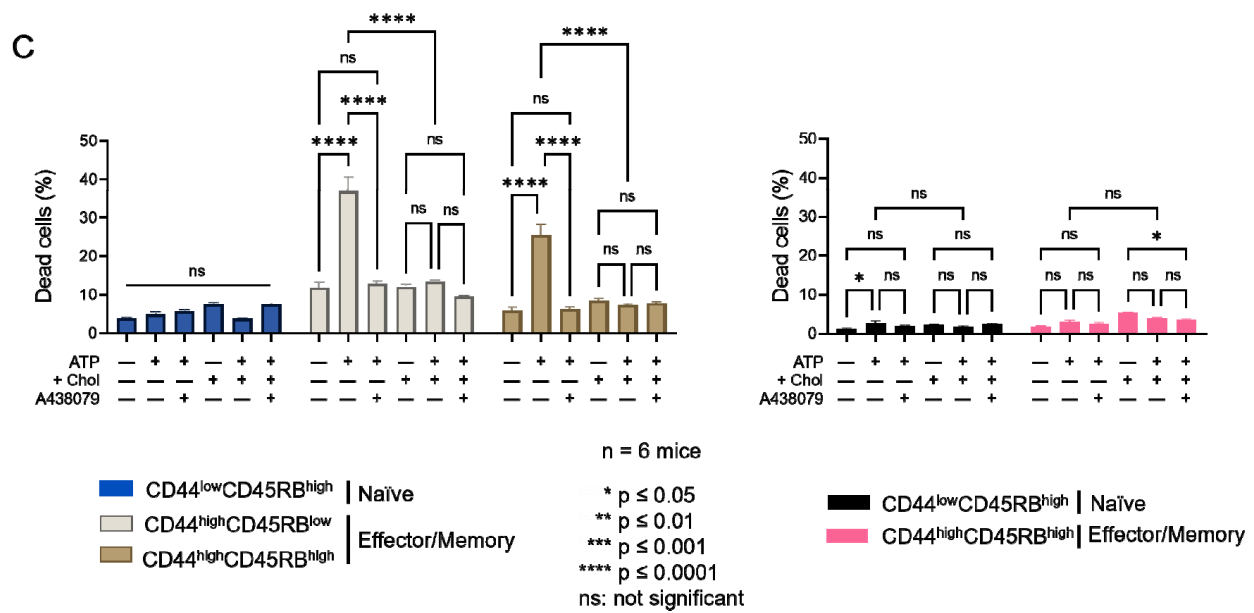


Figure 3. Amplitude of P2X7-induced cellular responses in T cells following plasma membrane cholesterol modulation. Amplitude of P2X7-mediated pore formation (A), CD62L shedding (B) and cell death (C) were evaluated among CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} or CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in the presence of 500 μM eATP for 30 min at 37 °C with or without pre-treatment with 10 μM of the P2X7 antagonist A438079 (+A438079), following ex vivo plasma membrane cholesterol enrichment using MBCD/Chol complexes. Data are expressed as the mean of percentages (±SEM, n ≥ 6 mice). Asterisks denote statistically significant differences * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns: not significant.

2.3. Diet-Induced Hypercholesterolemia Increase Effector/Memory CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Numbers in B6 Mice

We showed that increasing membrane cholesterol levels ex vivo negatively affects T-cell sensitivity to eATP (Figure 3). We therefore evaluated whether diet-induced hypercholesterolemia in B6 mice can modulate the amplitude of P2X7-mediated pore formation and CD62L shedding in CD4⁺ and CD8⁺ T cells at different stages of differentiation. Two independent experiments were performed for either 16 or 24 weeks, in which male B6 mice were fed a normal diet, or a diet enriched in lipids and supplemented with cholesterol (HFC diet) (Figure 4). In both experiments, HFC-fed mice displayed a marked increase in body weight to reach 38 ± 0.13 g after 16 and 46 ± 0.18 g after 24 weeks of the diet, versus 27 ± 0.1 g for mice receiving a normal diet (Figure 4A), along with a significant alteration in their ability to regulate glycaemia due to insulin resistance (Figure 4B). Importantly, HFC-fed mice showed a significant increase in circulating cholesterol levels, leading to chronic hypercholesterolemia, as shown by cholesterol blood measurements following a 24 h fast (Figure 4C). Interestingly, such metabolic dysregulation was associated with a decrease in the size of the CD44^{low}CD45RB^{high} naïve CD4⁺ T-cell subset and an increase in that of their CD44^{high}CD45RB^{low} effector/memory counterpart (Figure 5A). This increase was already significant after 16 weeks of the diet and became even more marked when the diet was extended to 24 weeks (Figure 5A). Unexpectedly, 24 weeks of the diet were required to significantly increase the numbers of CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory T cells in the CD8⁺ T-cell subpopulation (Figure 5B). We ascertained that the modification in the ratio between naïve and effector/memory T-cells resulted from metabolic changes induced by the HFC diet and not by direct alteration of the levels of CD44 and CD45RB membrane expression due to plasma membrane remodeling. Indeed, the mean fluorescence intensity (MFI) of CD44 and CD45RB membrane expression quantified by flow cytometry was not affected by cholesterol enrichment in splenocytes from mice fed a normal diet

treated with MBCD/Chol complexes *ex vivo* (data not shown). Moreover, MBCD/Chol treatment did not influence the ratio between the naïve and effector/memory phenotypes of either CD4⁺ or CD8⁺ T cell subpopulations relative to untreated splenocytes (Figure 5A,B), confirming the effect observed following the HFC diet. We further evaluated the effect of the HFC diet on membrane remodeling by evaluating the membrane levels of the lipid raft marker GM1, cholesterol, and P2X7 receptor. Surprisingly, neither 16 or 24 weeks of the HFC diet significantly modified the membrane levels of GM1, cholesterol, or P2X7 in T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) (Figure 5C). However, *ex vivo* treatment with MBCD/Chol complexes, well known to induce a massive increase in plasma membrane cholesterol content, resulted in a significant increase in both GM1 and cholesterol levels in the plasma membranes of CD4⁺ and CD8⁺ T cells regardless of their state of differentiation (Figure 5C). It is worth noting that treatment with MBCD/Chol complexes resulted in a significant decrease in P2X7 membrane expression by both naïve and effector/memory CD8⁺ T cells as well as by CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ T cells (Figure 5C, right panel). Altogether, our data suggest that diet-induced hypercholesterolemia was not sufficient to significantly modify the levels of GM1, cholesterol, or P2X7 at the T-cell plasma membrane. However, we cannot exclude the possibility that there were slight modifications that were not detectable using our fluorescent probes.

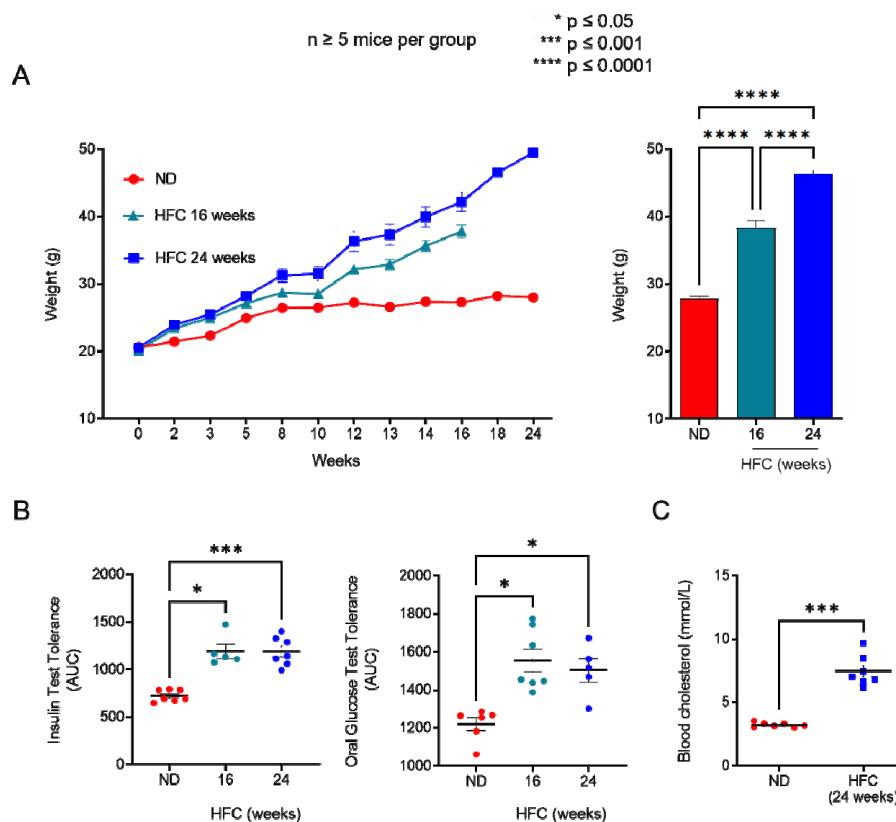


Figure 4. Diet-induced hypercholesterolemia in B6 mice. (A) Mean body weight of mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFC) presented as the weekly evolution (left panel) or following 16 or 24 weeks of the diet (right panel). (B) Insulin tolerance test (ITT, left panel) and oral glucose tolerance test (OGTT, right panel) performed on mice fed either a normal diet or a high-fat diet maintained for 16 and 24 weeks. (C) Level of circulating cholesterol in the blood of mice fed either a normal diet or a high-fat diet maintained for 24 weeks. Data are expressed as the mean of percentages (\pm SEM, $n \geq 5$ mice). Asterisks denote statistically significant differences: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

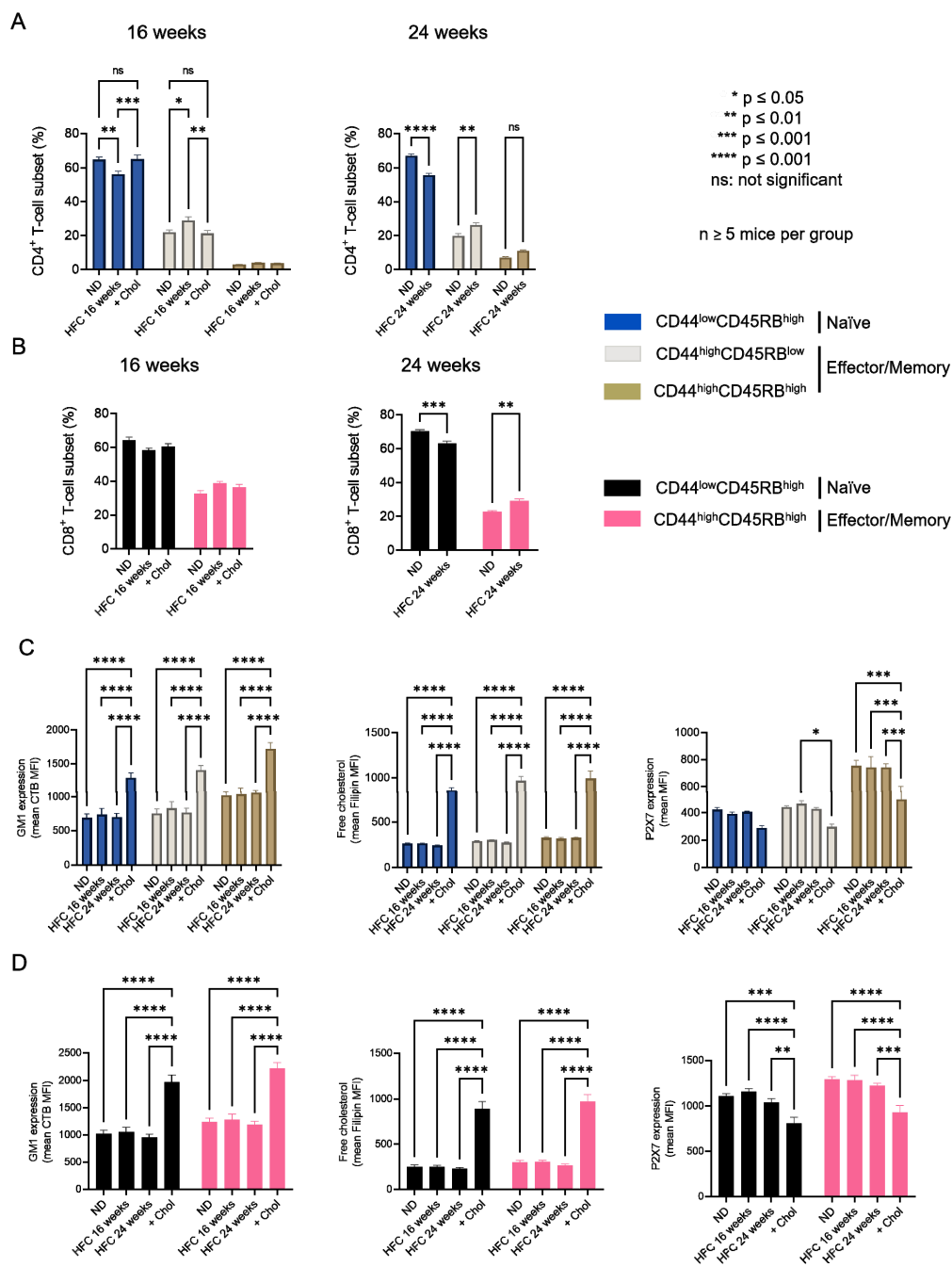


Figure 5. Impact of diet-induced hypercholesterolemia on the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in B6 mice. Percentage of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T-cell subsets quantified by flow cytometry for mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFC) maintained for 16 (left panel) or 24 weeks (right panel). Splenocytes from mice fed a normal diet were treated with MBCD/Chol complexes (+Chol) ex vivo as a positive control for cholesterol enrichment. (C,D) Plasma membrane levels of GM1, cholesterol, and P2X7 quantified by flow cytometry in splenocytes from mice fed either a normal diet or a high-fat diet maintained for 16 (left panel) or 24 weeks (right panel). Results are presented as the mean MFI values for GM1, cholesterol, and P2X7 among CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} or CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ (C) and CD8⁺ (D) T-cell subsets. Data are expressed as the mean of percentages (±SEM, n ≥ 5 mice). Asterisks denote statistically significant differences: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns: not significant.

2.4. Diet-Induced Hypercholesterolemia Affected P2X7-Induced Cellular Responses in Naïve and Effector/Memory CD4⁺ and CD8⁺ T Cells

The influence of diet-induced hypercholesterolemia on P2X7-induced cellular responses was evaluated in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from mice fed either a normal diet or a HFC diet for 16 and 24 weeks at various differentiation stages by their ability to form non-selective P2X7 pores, cleave homing CD62L molecules, externalize PS, and enter cell death following stimulation with 500 μ M eATP (Figures 6, 7 and A3). We treated splenocytes from mice receiving a normal diet with MBCD/Chol complexes *ex vivo* as a positive control of the cholesterol-dependent inhibition of P2X7-induced cellular responses in T cells. Such massive cholesterol enrichment led to the strong inhibition of all P2X7-induced cellular responses in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (either naïve or effector/memory) (Figures 6 and 7). Interestingly, the naïve CD8⁺ T-cell subset showed a significantly reduced ability to form P2X7-mediated pore following 16 weeks of the HFC diet, whereas 24 weeks of HFC diet were required to observe a similar inhibition of pore formation in their naïve and effector/memory CD4⁺ T-cell counterpart (Figures 6A and 7A). Moreover, pore formation was modulated in a dose-dependent manner as inhibition was higher following 24 rather than 16 weeks of the HFC diet and even stronger after *ex vivo* MBCD/Chol complexes treatment. Among P2X7-induced cellular responses, CD62L shedding displayed the highest sensitivity to plasma membrane cholesterol content. Indeed, 16 weeks of the HFC diet was sufficient to significantly inhibit the ability of naïve CD8⁺ and CD4⁺ T cells to shed CD62L molecules (Figures 6B and 7B). In addition, 24 weeks of the HFC diet or MBCD/Chol treatment *ex vivo* did not amplify the inhibition of P2X7-induced CD62L shedding, suggesting that maximum inhibition was already reached after 16 weeks (Figures 6B and 7B). Moreover, the stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets from B6 mice fed a normal diet with 500 μ M eATP for 30 min induced the externalization of PS, either in a reversible manner or associated with a decrease in cell size (FSC^{low}) and increase in cell granularity (SSC^{high}), characteristics of dying cells. Interestingly, after 24 weeks of the HFC diet, living FSC^{high}SSC^{low} CD8⁺ and CD4⁺ T cells displayed a significant reduction in their capacity to externalize PS, regardless of their stage of differentiation, naïve or effector/memory (Figures 6C and 7C). In accordance with our previous reports [16,17], under the condition of the normal diet, CD4⁺ T cells showed higher sensitivity to P2X7-induced cell death than CD8⁺ T cells (Figures 6D and 7D). After 16 weeks of the HFC diet, CD4⁺ T cells displayed a similar sensitivity to cell death as these from mice fed a normal diet (data not shown). However, after 24 weeks of the HFC diet, the percentages of CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and both CD44^{high}CD45RB^{low} and CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ T cells entering cell death significantly decreased following eATP stimulation (Figure 7D). Similarly, 24 weeks of the HFC diet significantly reduced the percentage of CD44^{low}CD45RB^{high} naïve CD8⁺ T cells entering cell death following eATP stimulation (Figure 6D). It is worth noting that the CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD8⁺ T cell subset, which display both the highest level of plasma membrane cholesterol and the lowest sensitivity to eATP among the T-cell subpopulations (Figures 1, 2 and 6), did not show any significant inhibition of P2X7-induced pore formation as well as CD62L shedding, PS externalization, or cell death following 16 or 24 weeks of the HFC diet (Figure 6). ATP induced cellular responses could be prevented by the P2X7 inhibitor A438079 (Figures 6 and 7) confirming the specificity of pore formation, CD62L shedding, PS externalization, and cell death. Altogether, these studies confirm the relationship between cholesterol intake and P2X7-induced cellular responses. Moreover, we highlight that CD62L shedding is more sensitive to cholesterol modulation than pore formation. Finally, we show that increased circulating cholesterol is responsible for the reduction in T-cell sensitivity to eATP stimulation.

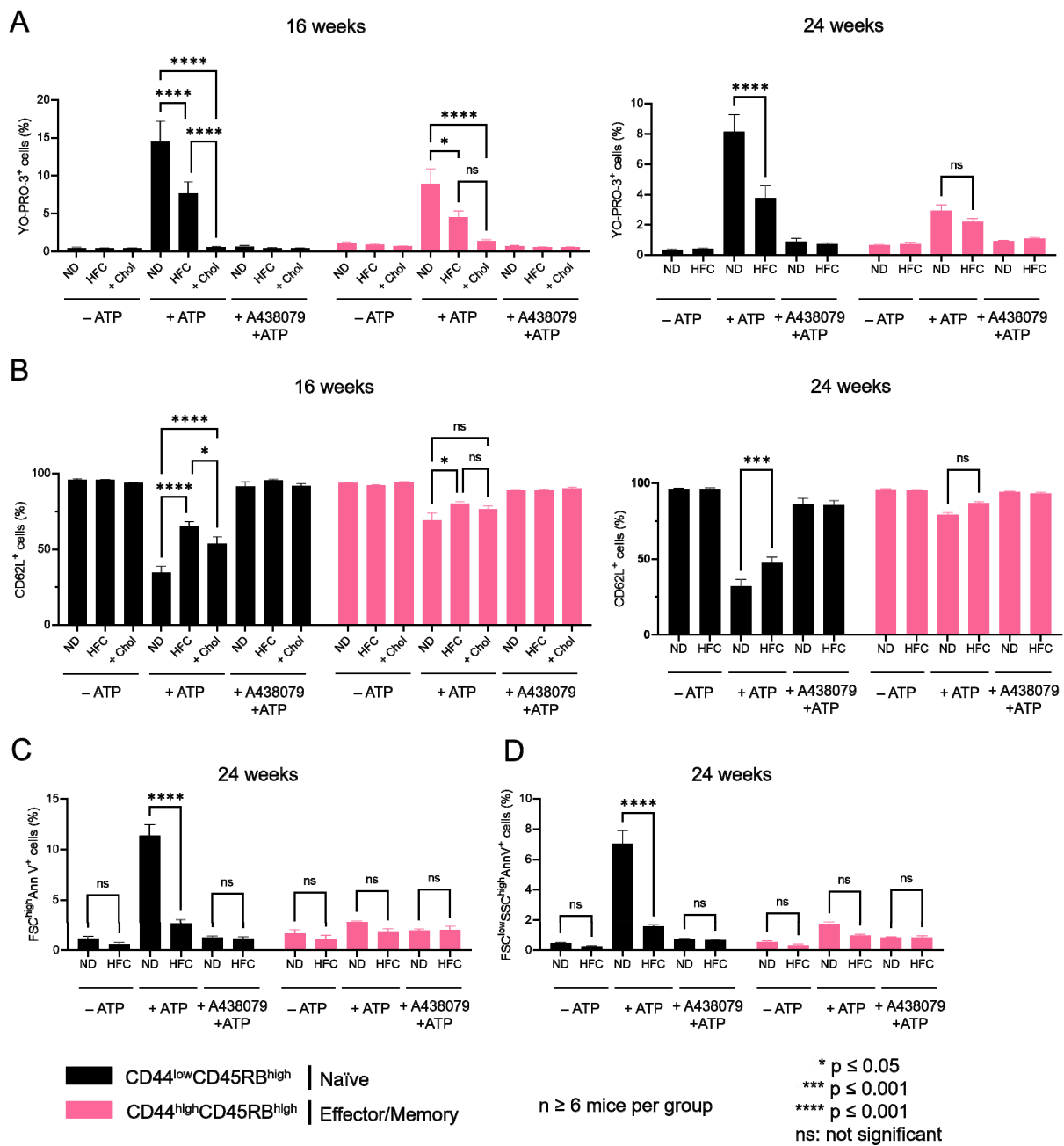


Figure 6. Diet-induced hypercholesterolemia affects P2X7-induced cellular responses in naive and effector/memory CD8⁺ T cells. Following stimulation with 500 μM eATP for 30 min at 37 °C with or without pre-treatment with 10 μM of the P2X7 antagonist A438079 (+A438079), P2X7-dependent pore formation (A), CD62L shedding (B), reversible PS externalization in living cells (FSC^{high}AnnV⁺) (C), and cell death characterized by irreversible PS externalisation (FSC^{low}SSC^{high}AnnV⁺) (D) were evaluated in CD44^{low}CD45RB^{high} naive and CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD8⁺ T cells from mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFC) maintained for 16 (left panel) or 24 weeks (right panel). Splenocytes from mice fed a normal diet were treated with MBCD/Chol complexes (+Chol) ex vivo as a positive control for cholesterol enrichment. Data are expressed as the mean of percentages (±SEM, n ≥ 6 mice). Asterisks denote statistically significant differences * p ≤ 0.05, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns: not significant.

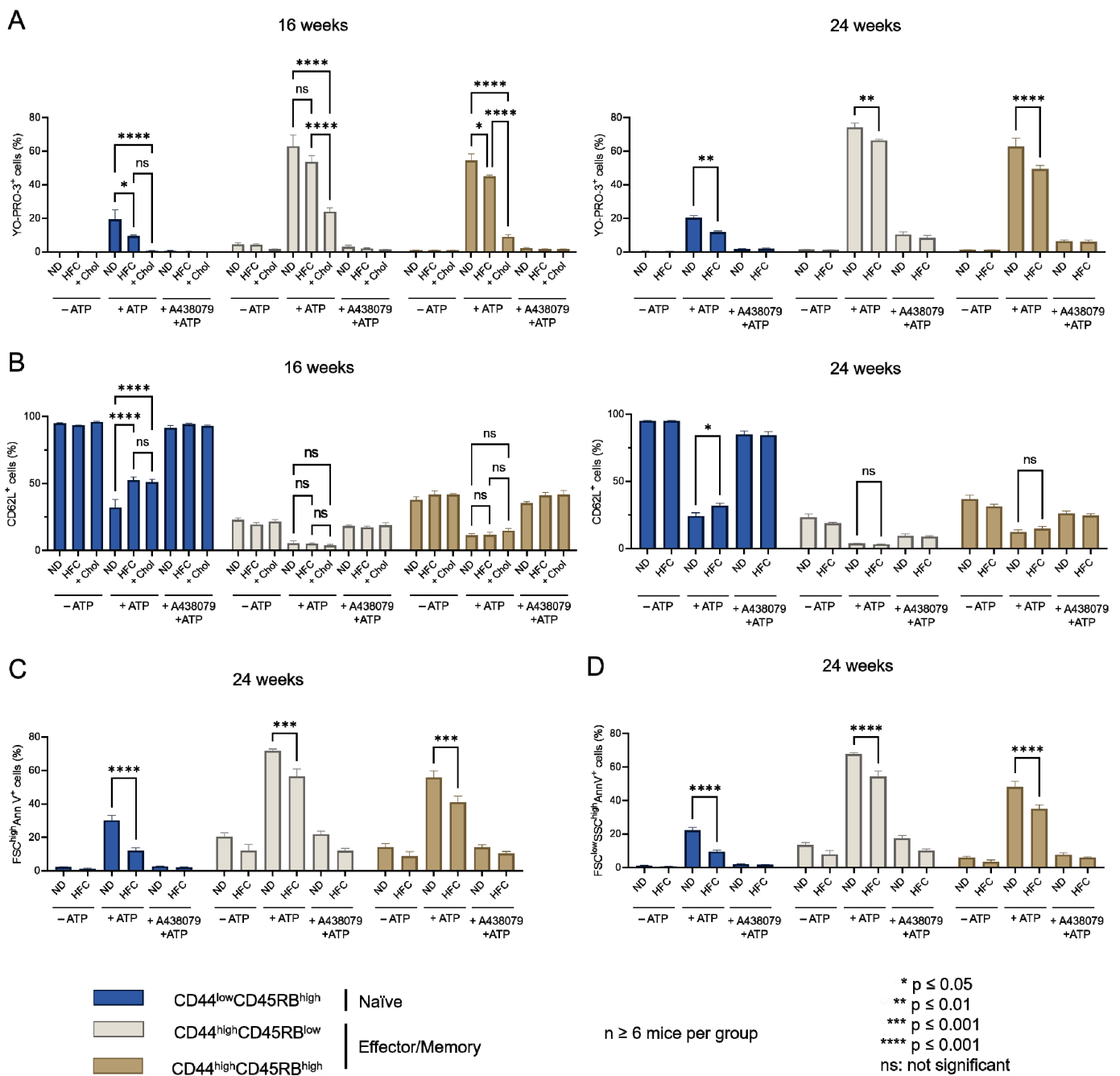


Figure 7. Diet-induced hypercholesterolemia affects P2X7-induced cellular responses in naive and effector/memory CD4⁺ T cells. Following stimulation with 500 μM eATP for 30 min at 37 °C with or without pre-treatment with 10 μM of the P2X7 antagonist A438079 (+A438079), P2X7-dependent pore formation (A), CD62L shedding (B), reversible PS externalization in living cells (FSC^{high}AnnV⁺) (C), and cell death characterized by irreversible PS externalisation (FSC^{low}SSC^{high}AnnV⁺) (D) were evaluated in CD44^{low}CD45RB^{high} naive and CD44^{high}CD45RB^{high} and CD44^{high}CD45RB^{low} effector/memory CD4⁺ T cells from mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFC) maintained for 16 (left panel) or 24 weeks (right panel). Splenocytes from normal diet-fed mice were treated with MBCD/Chol complexes (+Chol) ex vivo as positive control of cholesterol enrichment. Data are expressed as the mean of percentages (±SEM, n ≥ 6 mice). Asterisks denote statistically significant differences * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns: not significant.

3. Discussion

Previously, we reported that the sensitivity of the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations to eATP depends more on their stage of activation and differentiation than on their levels of membrane P2X7 [16,17]. Recently, we also showed that the sensitivity of leukemic T-cell lines to eATP is directly affected by their membrane cholesterol content and, therefore, by the localization of P2X7 within cholesterol-enriched microdomains [29]. Moreover, various studies have reported that plasma membrane cholesterol levels significantly fluctuate during the activation and differentiation of normal T cells [33]. Thus, T-cell activation through TCR signaling is highly dependent on plasma membrane cholesterol levels, well known to control immunological synapse formation through lipid raft aggregation [26]. In the present study, which is focused on the understanding of P2X7 signaling at the T-cell membrane, we therefore investigated whether there is a link between plasma membrane cholesterol levels and the cellular responses mediated by P2X7 in naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from B6 mice. BzATP is often used as a ligand of P2X7. However, it has been reported that BzATP triggers pore formation in lymphocytes with an EC₅₀ value of about 15 µM compared to 85 µM for ATP. Thus, BzATP stimulates P2X7-induced pore formation up to 30% more than ATP [34]. Therefore, in all our experiments, splenocytes have been activated with the physiological agonist ATP, instead of BzATP, to avoid an overstimulation of P2X7R-mediated cellular responses, which could have masked potential differences between T-cell subsets (either CD4⁺ or CD8⁺). For instance, the effector/memory CD44^{high}CD45RB^{low} CD4⁺ T-cell subset, which is particularly sensitive to ATP-induced cell death [16,17], is rapidly lost following BzATP stimulation, rendering challenging the comparison with other T-cell subset. For the first time, we highlight a negative correlation between P2X7-triggered cellular responses (i.e., pore formation, CD62L shedding, PS externalization, cell death) and the levels of plasma membrane cholesterol and the raft markers GM1 gangliosides in normal T cells. Indeed, CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} effector/memory CD4⁺ T-cell subsets from B6 mice showed high sensitivity to eATP, along with low levels of plasma membrane cholesterol and GM1 gangliosides. By contrast, CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ subsets, as well as CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD8⁺ T-cell subsets, showed poor sensitivity to eATP stimulation and high levels of both plasma membrane cholesterol and GM1 gangliosides. Importantly, and in agreement with our previous reports [16,17], these CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets showed higher levels of membrane P2X7 than highly eATP responsive CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} effector/memory CD4⁺ T-cell subsets. Overall, our data suggest that plasma membrane cholesterol and lipid rafts play a key role in the amplitude of P2X7-induced cellular responses in T cells. Therefore, we next investigated whether the modulation of plasma membrane cholesterol content can significantly affect the functionality of P2X7 in naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from B6 mice. Two experimental approaches were followed in the present study to modulate plasma membrane cholesterol content in T cells: (1) *in vitro* cholesterol depletion or loading using MBCD either alone or complexed with cholesterol; (2) *in vivo* diet-induced hypercholesterolemia. The use of MBCD to efficiently modulate plasma membrane cholesterol content *in vitro* has been validated by many studies [19,27,35]. Cholesterol depletion using MBCD alone did not allow us to significantly modify eATP sensitivity. This absence of an effect of cholesterol depletion could be explained by the presence of a large number of erythrocytes in the spleen-cell suspensions treated with MBCD, of which the plasma membrane is known to contain high levels of cholesterol. Thus, the MBCD molecules could have been saturated by erythrocyte cholesterol, rendering MBCD unable to reduce the cholesterol content in T cell plasma membrane. We did not eliminate erythrocytes from the spleen-cell suspension in our experiments because their lysis is well known to release large amounts of eATP, which non-specifically activates P2X7. On the contrary, plasma membrane cholesterol enrichment using MBCD/Chol complexes allowed a significant reduction in the amplitude of all P2X7-induced cellular responses in naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell

subsets, confirming the key role of plasma membrane cholesterol in the sensitivity of T cells to the eATP/P2X7 pathway. However, as the use of MBCD/Chol complexes is far from being physiological, we performed *in vivo* experiments using a high-fat diet. Thus, following 16 and 24 weeks of a HFC diet, B6 mice presented all the expected parameters of diet-induced obesity. In particular, they showed a massive increase in body weight (around 40%) and plasma levels of cholesterol (2-fold), as well as severe liver steatosis shown by histology analysis. They also showed impaired insulin sensitivity associated with glucose resistance. Therefore, our model was suitable for evaluating the link between P2X7 sensitivity in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and increasing cholesterol levels in the plasma membrane due to diet-induced hypercholesterolemia. In parallel, we treated splenocytes from mice fed a normal diet using MBCD/Chol complexes *ex vivo* to ascertain that the reduction in P2X7 sensitivity of the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets following the HFC diet was mainly dependent on plasma membrane cholesterol modulation and not the consequences of the modulation of various biological parameters linked to obesity. In addition, the MFI for CD44 and CD45RB differentiation markers was not affected in splenocytes treated with MBCD/Chol *ex vivo*, confirming that changes in the ratio between CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD4⁺CD44^{high}CD45RB^{low} and CD8⁺CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory T cells observed following the HFC diet resulted from metabolic changes and not from direct alterations of the levels of membrane CD44 and CD45RB due to plasma membrane remodeling. Indeed, diet-induced obesity in B6 mice has been extensively reported to be associated with a strong inflammatory response [36]. Moreover, MBCD/Chol treatment is also used as a control of maximum cholesterol loading of T cells due to its ability to increase plasma membrane cholesterol to a content that cannot be obtained through a HFC diet. Satisfyingly, the reduction in P2X7 sensitivity observed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from mice fed the HFC diet for 16 or 24 weeks showed a similar profile as that observed after *ex vivo* plasma membrane cholesterol enrichment using MBCD/Chol complexes, confirming that the effect of diet-induced obesity on T-cell sensitivity to eATP was mainly due to plasma membrane cholesterol enrichment. Moreover, these results highlight the positive correlation between circulating and plasma membrane cholesterol levels in T cells and, consequently, the amplitude of P2X7-induced cellular responses. Interestingly, the inhibition of P2X7 induced by plasma membrane cholesterol loading showed different profiles depending on the cellular function considered. Thus, the levels of inhibition of pore formation obtained in the MBCD/Chol group were significantly higher than those obtained in the HFC diet groups maintained for 16 and even 24 weeks. By contrast, the inhibition of CD62L shedding reached a maximum at 16 weeks of the HFC diet and could not be increased following MBCD/Chol treatment. Moreover, CD4⁺ T-cell subsets, which present both higher sensitivity to eATP and lower plasma membrane cholesterol content than CD8⁺ T-cell subsets, appeared to be more highly affected by plasma membrane cholesterol enrichment. These results suggest the existence of a dose-dependent effect on the cholesterol inhibition of P2X7, in particular, concerning pore formation, but not CD62L shedding, at least in our present experiments. As CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets do not show the same initial characteristics in terms of plasma membrane cholesterol and lipid raft content, the direct and indirect effects of cholesterol could explain the differences observed in the amplitude of P2X7-induced cellular responses among these various subsets. Indeed, the modulation of protein function by plasma membrane cholesterol can either be direct, through the binding of cholesterol to the protein, or indirect, through changes in the fluidity and thickness of the plasma membrane. As we have previously shown, increases in plasma membrane cholesterol levels negatively affected calcium entry in response to eATP stimulation [29]. As the influx of calcium directly depends on changes in the P2X7 trimer conformation, these data suggest a direct influence of cholesterol on the sensitivity of P2X7 in agreement with [22]. By contrast, other P2X7-induced cellular responses, in particular PS externalization and CD62L shedding, appear to be more dependent on membrane composition, although they required an initial intracellular signal such as Ca²⁺ influx. Interestingly, CD62L shedding by ADAM 17 may be dependent on PS externalization [37].

Therefore, the impact of plasma membrane cholesterol on these cellular responses may be more highly associated with its influence on plasma membrane fluidity and protein mobility than on direct P2X7 sensitivity. Finally, ADAM 17 is constitutively located within cholesterol-enriched microdomains, but cholesterol depletion by MBCD increases ADAM 17-dependent shedding of membrane anchored proteins, which may be due to increased substrate accessibility. However, intracellular signals such as Ca^{2+} influx or PKC signaling are still required to initiate ADAM-dependent membrane protein shedding, even following cholesterol depletion. Altogether, our data contribute to explain why the modulation of plasma membrane cholesterol content does not similarly affect all P2X7-induced cellular responses in $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell subsets.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

ATP⁴⁻ (adenosine-5'-triphosphate), P2X7 receptor antagonist A438079, methyl- β -cyclodextrin (MBCD), FITC-conjugated cholera toxin B subunit (CTB), filipin III from *Streptomyces filipinensis*, cholesterol ($\geq 99\%$), and bovine serum albumin (BSA) were all purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The YO-PRO-3 fluorescent probe (Molecular Probes) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France).

4.2. Mice

Wildtype C57BL/6J (B6) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Animal protocols were approved by local and national ethics committees for research (agreement number: #20833). All mouse strains were maintained in our animal facilities (Plateforme Animex, Animalerie de l'Institut Paris-Sud d'Innovation thérapeutique).

4.3. Diet

Mice were either fed a normal diet (ND) or a high fat diet (34% lard, 8.3% saturated fatty acids, 4.5% mono-unsaturated fatty acid and 5.8% poly-unsaturated fatty acids) supplemented with 1% cholesterol (HFC) (Ssniff, Soest, Germany) [38]. All diets were supplied ad libitum for 16 to 24 weeks. The weight of the mice was monitored every week.

4.4. Metabolic Assay

Glucose sensitivity was assessed by an oral glucose tolerance test (OGTT). The glucose load (2 g/kg) was given by gavage after 6 h of fasting and blood samples were harvested at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min after gavage. Serum glucose concentrations were determined using the Accu-Chek Performa test (Roche, Basel, Switzerland) and the area under the glucose–time curve was calculated.

4.5. Serological Parameters

Circulating cholesterol levels were quantified in B6 mice serum using a AU400 chemistry analyzer (Olympus AU400, Biochemistry laboratory facility, UMR1149 INSERM-Université Paris Diderot, Paris, France).

4.6. Plasma Membrane Cholesterol Modulation

Plasma membrane cholesterol content was increased ex vivo by treating spleen cells from B6 mice with MBCD/Chol complexes at a 12:1 molar ratio in RPMI 1640 medium for 2 h at 37 °C. MBCD/Chol complexes were subsequently removed after extensively washing the cells with ice-cold RPMI 1640 medium. Plasma membrane cholesterol content was decreased by treating B6 spleen cells with 5 mM MBCD in RPMI 1640 medium for 20 min at 37 °C and then removed by washing cells extensively with ice-cold RPMI 1640 medium.

4.7. T Lymphocyte Phenotyping

Splenocyte From B6 mice fed a normal or high-fat diet were phenotyped by flow cytometry using fluorescent-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) directed against the cell surface markers CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), CD45RABC/B220 (clone RA3-6B2), CD4 (clone GK1.5), CD8 α (clone 53-6.7), CD45RB (clone C363.16A), CD44 (clone IM7), CD62L (clone MEL-14), and P2X7 (clone 1F11) (all from eBioscience, San Diego, CA, USA). Cell membrane cholesterol was stained with filipin III. Binding of FITC-labeled CTB was used to measure ganglioside GM1 plasma membrane expression. Fluorescent-conjugated rat or mouse IgG1, IgG2a, or IgG2b, Armenian hamster IgG mAbs, or rabbit IgG polyclonal serum were used as isotype controls (eBioscience). Anti-mouse Fc γ receptor mAb (clone 93, eBioscience) were used to avoid non-specific antibody binding. At least 20,000 events were analyzed for each sample. Cell debris, dead cells, and doublets were gated out using the physical characteristics of cell-like granularity (side scatter, SSC) and size (forward scatter, FSC). Data acquisition was performed at the Flow Cytometry Core Facility at IPSIT (Clamart, France). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo v10.8.1 (BD, Ashland, OR, USA) software.

4.8. ATP-Mediated Cellular Function Assays

Assays for P2X7-induced CD62L shedding, phosphatidylserine (PS) externalization, and pore formation were performed as previously described [16–18,39]. Briefly, splenocytes (10^6 cells/mL) suspended in RPMI 1640 culture medium were stimulated with 500 μ M eATP in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 30 min. Then, cells suspensions were washed and labelled for 30 min on ice with phenotype-specific fluorescent mAbs and fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb, and Annexin V fluorescent probe to assess CD62L shedding and PS externalization. To measure P2X7-mediated pore formation, eATP stimulation was performed in the presence of YO-PRO-3 fluorescent dye (Thermo Fisher Scientific). In certain experiments, cells were pre-treated with 10 μ M of the competitive P2X7 antagonist A438079 for 20 min before treatment with eATP. Data acquisition was performed at the Flow Cytometry Core Facility at IPSIT (Clamart, France). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo v10.8.1 (BD, Ashland, OR, USA) software.

4.9. Statistical Analysis

Data are reported as the mean \pm SEM. Experimental and control groups were compared using unpaired two-tailed Student's *t*-tests or ANOVA. Statistical significance is indicated as follows: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns = not significant.

Author Contributions: Conceptualization, T.H.-H., A.M. and P.B.; methodology, T.H.-H., A.M. and P.B.; validation, T.H.-H., A.M. and P.B.; formal analysis, T.H.-H., A.M. and P.B.; investigation, T.H.-H., A.M. and P.B.; resources, N.T. and A.-M.C.; writing—original draft preparation, T.H.-H. and P.B.; writing—review and editing, T.H.-H., A.M., N.T., A.-M.C. and P.B.; supervision, P.B.; project administration, P.B.; funding acquisition, P.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by grants from the ANR—Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-ISV6-0003).

Institutional Review Board Statement: Animal protocols were approved by local and national ethics committees for research (agreement number: #20833).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

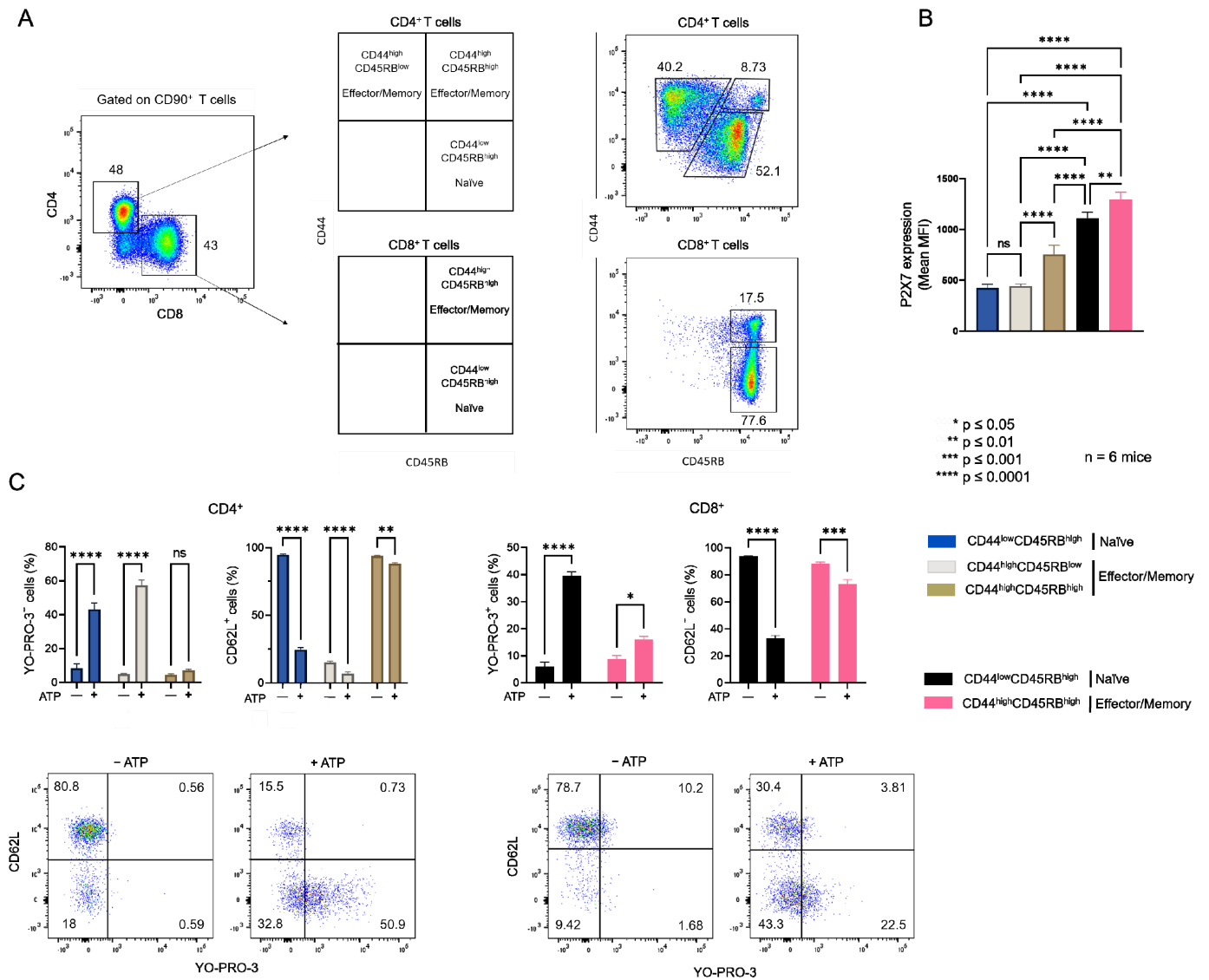


Figure A1. P2X7-mediated cellular responses depend on the differentiation stage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (A) Gating strategy for the identification of CD44^{low}CD45RB^{high} naive and CD44^{high}CD45RB^{high} or CD44^{low}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from mouse spleens. (B) Plasma membrane levels of P2X7 was quantified by flow cytometry using BV605-conjugated anti-P2X7 extracellular domain mAb. (C) P2X7-dependent pore formation (left panel) and shedding of CD62L (right panel) were evaluated for the various stages of differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells following stimulation with 500 μ M eATP for 30 min at 37 °C. Results are presented as mean histograms and dot plots representative of the experiments. Data are expressed as the mean of percentages (\pm SEM, $n \geq 6$ mice). Asterisks denote statistically significant differences * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns: not significant.

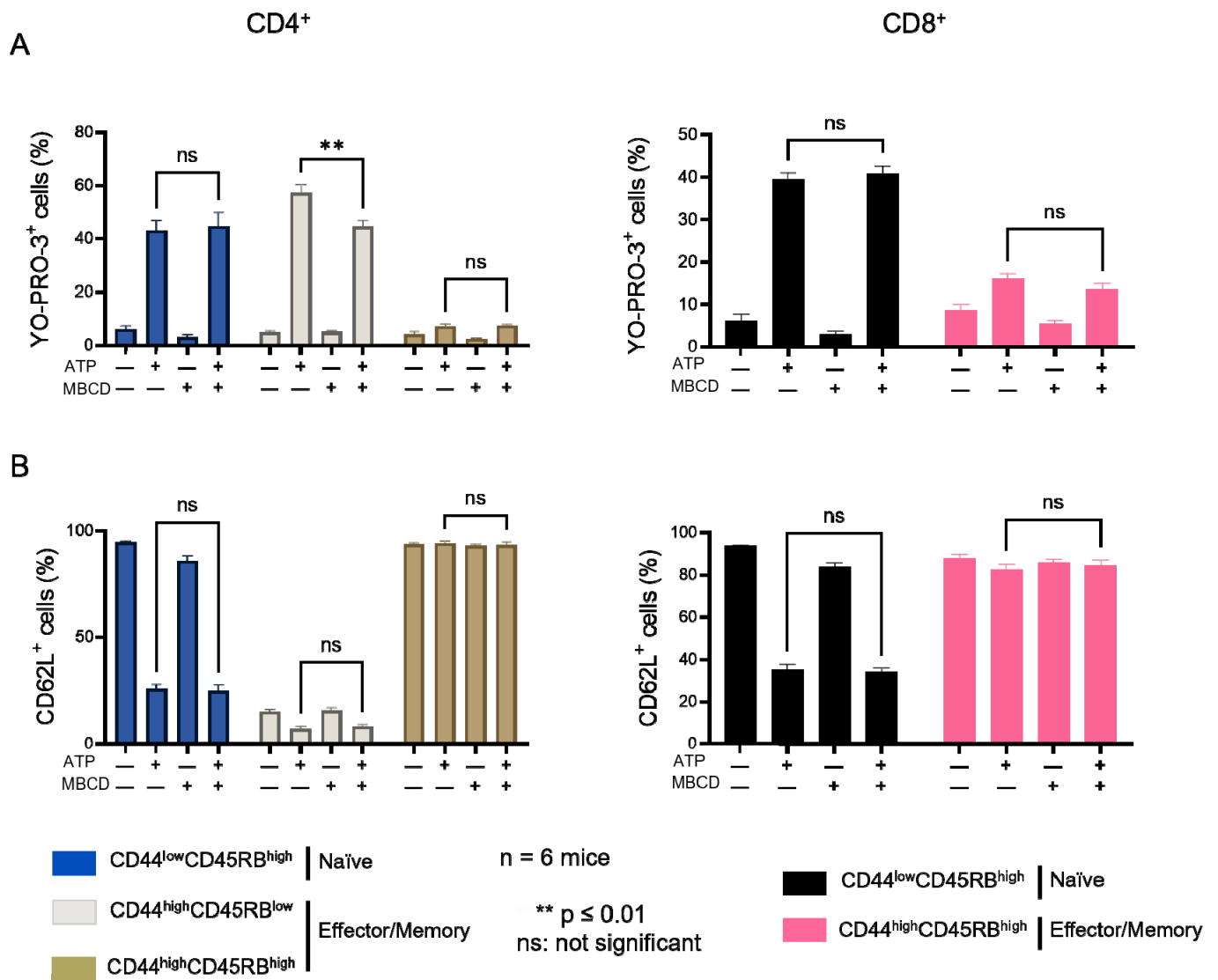


Figure A2. Amplitude of P2X7-induced cellular responses in T cells following plasma membrane cholesterol depletion by MBCD. Amplitude of P2X7-mediated pore formation (A) and CD62L shedding (B) were evaluated among CD44^{low}CD45RB^{high} naïve and CD44^{high}CD45RB^{low} or CD44^{high}CD45RB^{high} effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in the presence of 500 μM eATP for 30 min at 37 °C following ex vivo plasma membrane cholesterol depletion using 5 mM MBCD for 20 min at 37 °C. Data are expressed as the mean of percentages (±SEM, n ≥ 6 mice). Asterisks denote statistically significant differences ** p ≤ 0.01, ns: not significant.

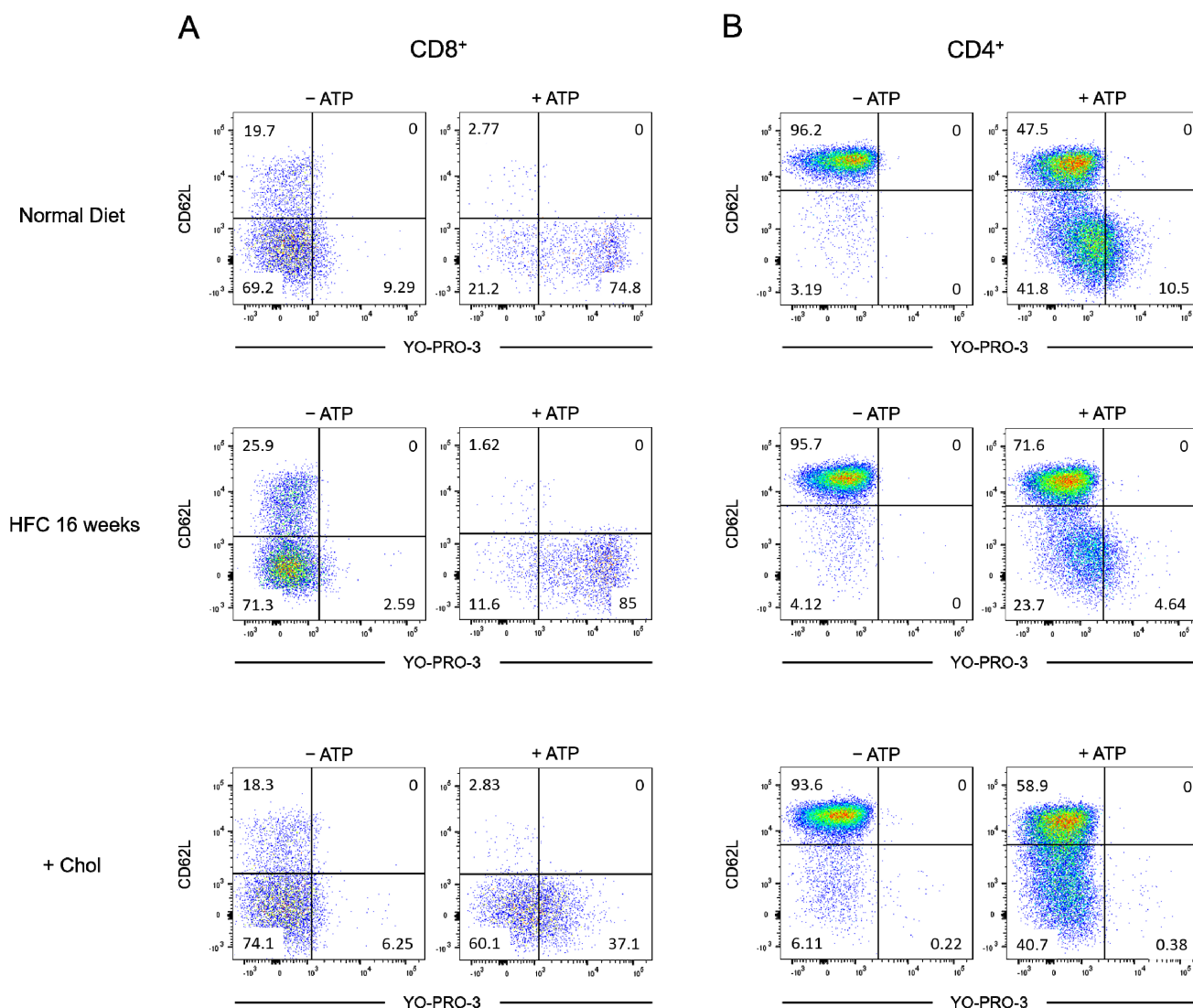


Figure A3. Diet-induced hypercholesterolemia affects P2X7-induced cellular responses in naive and effector/memory CD8⁺ and CD4⁺ T cells. Flow cytometry dot plots representative of the P2X7-induced cellular function assay performed on CD8⁺ (A) and CD4⁺ (B) T-cell subsets from mice fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFC) maintained for 16 weeks or on splenocytes from normal fed mice treated ex vivo with MBCD/Chol complexes (+Chol).

References

- Sluyter, R. The P2X7 Receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *1051*, 17–53. [[PubMed](#)]
- Di Virgilio, F.; Dal Ben, D.; Sarti, A.C.; Giuliani, A.L.; Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **2017**, *47*, 15–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wiley, J.S.; Chen, R.; Wiley, M.J.; Jamieson, G.P. The ATP4—Receptor-operated ion channel of human lymphocytes: Inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by extracellular sodium ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *292*, 411–418. [[CrossRef](#)]
- Mackenzie, A.B.; Young, M.T.; Adinolfi, E.; Surprenant, A. Pseudoapoptosis Induced by Brief Activation of ATP-gated P2X7 Receptors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33968–33976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steinberg, T.H.; Newman, A.S.; Swanson, J.A.; Silverstein, S.C. ATP4—Permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8884–8888. [[CrossRef](#)]
- Surprenant, A.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; North, R.A.; Buell, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **1996**, *272*, 735–738. [[CrossRef](#)]
- Ferrari, D.; Los, M.; Bauer, M.K.; Vandenabeele, P.; Wesselborg, S.; Schulze-Osthoff, K. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* **1999**, *447*, 71–75. [[CrossRef](#)]

8. Humphreys, B.D.; Rice, J.; Kertesz, S.B.; Dubyak, G.R. Stress-activated Protein Kinase/JNK Activation and Apoptotic Induction by the Macrophage P2X7 Nucleotide Receptor. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26792–26798. [[CrossRef](#)]
9. Auger, R.; Motta, I.; Benihoud, K.; Ojcius, D.M.; Kanellopoulos, J.M. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28142–28151. [[CrossRef](#)]
10. Adinolfi, E.; Callegari, M.G.; Cirillo, M.; Pinton, P.; Giorgi, C.; Cavagna, D.; Di Virgilio, F. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10120–10128. [[CrossRef](#)]
11. Adinolfi, E.; Cirillo, M.; Woltersdorf, R.; Falzoni, S.; Chiozzi, P.; Pellegatti, P.; Callegari, M.G.; Sandonà, D.; Markwardt, F.; Schmalzing, G.; et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3393–3404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Baricordi, O.R.; Ferrari, D.; Melchiorri, L.; Chiozzi, P.; Hanau, S.; Chiari, E.; Rubini, M.; Di Virgilio, F. An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* **1996**, *87*, 682–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Giuliani, A.L.; Sarti, A.C.; Falzoni, S.; Di Virgilio, F. The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Le Gall, S.M.; Bobé, P.; Reiss, K.; Horiuchi, K.; Niu, X.D.; Lundell, D.; Blobel, C.P. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1785–1794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kopp, R.; Krautloher, A.; Ramírez-Fernández, A.; Nicke, A. P2X7 Interactions and Signaling—Making Head or Tail of It. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 183. [[CrossRef](#)]
16. Safya, H.; Mellouk, A.; Legrand, J.; Le Gall, S.M.; Benbijja, M.; Kanellopoulos-Langevin, C.; Kanellopoulos, J.M.; Bobé, P. Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 360. [[CrossRef](#)]
17. Mellouk, A.; Bobé, P. CD8(+), but not CD4(+) effector/memory T cells, express the CD44 (high) CD45RB (high) phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses. *FASEB J.* **2019**, *33*, 3225–3236. [[CrossRef](#)]
18. Le Gall, S.M.; Legrand, J.; Benbijja, M.; Safya, H.; Benihoud, K.; Kanellopoulos, J.M.; Bobé, P. Loss of P2X7 Receptor Plasma Membrane Expression and Function in Pathogenic B220+ Double-Negative T Lymphocytes of Autoimmune MRL/lpr Mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52161. [[CrossRef](#)]
19. Garcia-Marcos, M.; Peérez-Andrés, E.; Tandel, S.; Fontanils, U.; Kumps, A.; Kabré, E.; Goémez-Muñoz, A.; Marino, A.; Dehaye, J.-P.; Pochet, S. Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 705–714. [[CrossRef](#)]
20. Gonnord, P.; Delarasse, C.; Auger, R.; Benihoud, K.; Prigent, M.; Cuif, M.H.; Lamaze, C.; Kanellopoulos, J.M. Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J.* **2008**, *23*, 795–805. [[CrossRef](#)]
21. Murrell-Lagnado, R.D. Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol. *Curr. Top. Membr.* **2017**, *80*, 211–232. [[PubMed](#)]
22. McCarthy, A.E.; Yoshioka, C.; Mansoor, S.E. Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell* **2019**, *179*, 659–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Karasawa, A.; Michalski, K.; Mikhelzon, P.; Kawate, T. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *eLife* **2017**, *6*, e31186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Robinson, L.E.; Shridar, M.; Smith, P.; Murrell-Lagnado, R.D. Plasma Membrane Cholesterol as a Regulator of Human and Rodent P2X7 Receptor Activation and Sensitization. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 31983–31994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bietz, A.; Zhu, H.; Xue, M.; Xu, C. Cholesterol Metabolism in T Cells. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zumerle, S.; Molon, B.; Viola, A. Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1467. [[CrossRef](#)]
27. Mahammad, S.; Parmryd, I. Cholesterol depletion using methyl-beta-cyclodextrin. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1232*, 91–102.
28. Hanada, K.; Nishijima, M.; Akamatsu, Y.; Pagano, R.E. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6254–6260. [[CrossRef](#)]
29. Hutteau-Hamel, T. P2X7 Receptor Activation by Extracellular ATP in Mouse T-Cell Lines Depends on its Plasma Membrane Localization Driven by Membrane Cholesterol Content. Ph.D. Thesis, Paris-Saclay University, Clamart, France, 2022.
30. Sezgin, E.; Schwille, P. Fluorescence techniques to study lipid dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a009803. [[CrossRef](#)]
31. Brumeanu, T.-D.; Preda-Pais, A.; Stoica, C.; Bona, C.; Casares, S. Differential partitioning and trafficking of GM gangliosides and cholesterol-rich lipid rafts in thymic and splenic CD4 T cells. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 530–540. [[CrossRef](#)]
32. Thomas, S.; Kumar, R.; Casares, S.; Brumeanu, T.-D. Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane. *J. Immunol. Methods* **2003**, *275*, 161–168. [[CrossRef](#)]

33. Bonacina, F.; Coe, D.; Wang, G.; Longhi, M.P.; Baragetti, A.; Moregola, A.; Garlaschelli, K.; Uboldi, P.; Pellegatta, F.; Grigore, L.; et al. Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gargett, C.E.; Cornish, J.E.; Wiley, J.S. ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1997**, *122*, 911–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zidovetzki, R.; Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1311–1324. [[CrossRef](#)]
36. Avtanski, D.; Pavlov, V.A.; Tracey, K.J.; Poretsky, L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Anim. Model. Exp. Med.* **2019**, *2*, 252–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Reiss, K.; Leitzke, S.; Seidel, J.; Sperrhacker, M.; Bhakdi, S. Scramblases as Regulators of Proteolytic ADAM Function. *Membranes* **2022**, *12*, 185. [[CrossRef](#)]
38. Ferrere, G.; Leroux, A.; Wrzosek, L.; Puchois, V.; Gaudin, F.; Ciocan, D.; Renoud, M.-L.; Naveau, S.; Perlemuter, G.; Cassard, A.-M. Activation of Kupffer Cells Is Associated with a Specific Dysbiosis Induced by Fructose or High Fat Diet in Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146177. [[CrossRef](#)]
39. Benbijja, M.; Mellouk, A.; Bobé, P. Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 251. [[CrossRef](#)]

VI. Conclusion et Discussion

Les travaux antérieurs de notre équipe ont révélé la complexité du mode de fonctionnement du récepteur P2X7 des lymphocytes T et son rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T effecteurs. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des différences de sensibilité à l'ATP⁴⁻ en fonction d'une part du phénotype des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ et d'autre part de leur état d'activation et de différenciation. Ainsi, les sous-populations lymphocytaires T n'expriment pas toutes les mêmes taux de P2X7 à leur membrane et de façon inattendue leur sensibilité à l'ATP⁴⁻ n'est pas corrélée à ce taux d'expression. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs de phénotype CD44^{low}CD45RB^{high} expriment des taux similairement faibles de P2X7 à leur surface mais présentent une forte capacité à induire le clivage de CD62L en réponse à une stimulation par l'ATP⁴⁻ et dans une moindre mesure à ouvrir le canal cationique, à former le pore non sélectif, à externaliser les phosphatidylsérines et à induire la mort cellulaire. À l'inverse, les lymphocytes T CD8⁺ effecteur/mémoire de phénotype CD44^{high}CD45RB^{high} expriment des taux de P2X7 membranaires équivalents à ceux mesurés à l'état naïf mais sont totalement réfractaires à une stimulation par l'ATP⁴⁻. Ainsi, notre équipe a montré pour la première fois que, dans les lymphocytes T CD4⁺ (conventionnels et régulateurs) et CD8⁺, les différentes fonctions cellulaires de P2X7 sont indépendantes les unes des autres [2, 3]. Il est particulièrement intéressant de noter que les lymphocytes T naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} récemment activés de phénotype CD69⁺, malgré une augmentation de leur taux d'expression de P2X7 par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs CD69⁻, perdent totalement leur capacité à activer les métalloprotéases de membrane et donc à cliver CD62L alors que les autres fonctions cellulaires associées à la stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ sont conservées. Cette dissociation des fonctions favorise leur capacité proliférative par augmentation de l'influx calcique tout en maintenant leur capacité de homing vers les ganglions lymphatiques par la molécule CD62L.

D'autre part, le récepteur P2X7 a été identifié par notre équipe comme responsable, en synergie avec le récepteur d'apoptose Fas, de la régulation de l'homéostasie des lymphocytes T effecteurs. En effet, notre équipe a d'abord montré que les lymphocytes T pathologiques CD4⁻CD8⁻ (DN) B220⁺ de la souris MRL/lpr présentait une diminution massive de leur taux d'expression membranaire en P2X7 associée à une perte totale des réponses cellulaires après stimulation par l'ATP⁴⁻. Par la création d'un nouveau modèle de souris B6/lpr déficientes pour P2X7, notre équipe a ensuite mis en évidence que la perte d'expression du récepteur

purinergique P2X7 associée à celle du récepteur d'apoptose Fas (mutation *lpr*) entraîne une dérégulation complète de l'homéostasie des lymphocytes T en réponse secondaire à l'origine du développement de pathologies auto-immunes de type lupique. Les souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent ainsi une lymphoaccumulation massive de lymphocytes T pathologiques DN B220⁺ responsables d'une splénomégalie et de lymphadénopathies, des taux anormalement élevés de cytokines inflammatoires dont l'IL-6, le TNF- α , l'IL-1 β ou l'IFN- γ , en cytokines IL-10 et BAFF impliquées dans la maturation des lymphocytes B en plasmocytes de longue durée de vie à l'origine des taux élevés d'auto-anticorps anti-ADN double brin, et des infiltrations massives de lymphocytes T au sein de différents organes dont les poumons, les reins et le foie associées à des destructions tissulaires. Dans le fond génétique B6, la déficience en récepteur P2X7 n'entraîne aucun phénotype et celle en récepteur Fas (B6/*lpr*) n'entraîne que le développement d'une pathologie auto-immune de type lupique de sévérité modérée comparée à celle des souris MRL/*lpr*, confirmant ainsi l'effet synergique des récepteurs Fas et P2X7. En conséquence, le phénotype auto-immun modéré observé chez les souris B6/*lpr* comparé au modèle MRL/*lpr* est en faveur d'une possible altération de la voie P2X7/ATP chez les souris MRL/*lpr*. Cependant, ces souris présentent un récepteur P2X7 fonctionnel aussi bien du point de vue génétique que cellulaire. La perte des fonctions cellulaires de P2X7 observée chez les souris MRL/*lpr*, au sein de la population lymphocytaires T pathologiques DN B220⁺, suggère l'influence de l'isoforme B220 de la tyrosine phosphatase de membrane CD45 (CD45RABC). Les lymphocytes T pathologiques DN B220⁺ ne peuvent pas être maintenu en culture *ex vivo* ce qui d'ailleurs met en évidence l'importance du contexte cytokinique dans la lymphoaccumulation des souris MRL/*lpr*. En conséquence, nous avons sélectionné les 2 lignées tumorales lymphocytaires T EL4 et L1210 afin d'étudier l'implication de la phosphatase B220 dans la perte de fonctionnalité du P2X7 des lymphocytes T pathologiques. Ces lymphomes T ont été choisis car ils présentent des taux similaires d'expression membranaire de P2X7 mais des sensibilités très différentes à l'ATP⁴⁻. L'EC₅₀ pour la formation du pore non sélectif est par exemple de 400 μ M pour les cellules de la lignée EL4 contre 2000 μ M pour les lymphocytes L1210. De plus, les cellules de la lignée L1210 expriment B220 à leur membrane de façon constitutive. B220 présentent une partie extracellulaire richement glycosylée, d'ailleurs responsables d'un encombrement stérique empêchant sa dimérisation inhibitrice [401]. Nous avons donc testé l'influence de cette partie extracellulaire sur la sensibilité du récepteur P2X7 des lymphocytes T de la lignée L1210 en évaluant les réponses cellulaires induites par une

stimulation par l'ATP⁴⁻ après clivage de cette partie extracellulaire par la trypsine. Ce traitement a permis d'éliminer la partie extracellulaire de B220 mais pas de rétablir les fonctions cellulaires de P2X7. Pour s'assurer de l'absence d'effet de la trypsine sur l'expression de P2X7, les cellules de la lignée EL4, qui ne présentent pas de molécule B220 à sa membrane, ont été traitées par la trypsine. Ce traitement n'a eu aucune influence sur l'amplitude des réponses cellulaires induites par la stimulation de P2X7. D'autre part, B220 présente une forte activité phosphatase intracellulaire. La stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ induisant la phosphorylation de nombreuses protéines de signalisation, notamment la kinase ERK 1/2, nous avons évalué l'effet de l'activité tyrosine phosphatase de B220 sur les fonctions cellulaires de P2X7. B220 résulte de l'épissage alternatif de CD45 et il n'est donc pas possible d'inhiber spécifiquement son expression par des techniques telles que le siRNA ou le shRNA. De plus, aucun inhibiteur spécifique de l'activité phosphatase de B220 n'est actuellement disponible. Nous avons donc utilisé du pervanadate, permettant l'inhibition irréversible de l'ensemble des activités tyrosine phosphatase intracellulaires. L'étude par western blot et par cytométrie en flux de la phosphorylation de ERK 1/2 nous a permis de montrer que les cellules de la lignée EL4 présentent une activité pERK importante cohérente avec leur forte capacité proliférative. De façon plus inattendue, les lymphomes L1210 présentent un taux nul de pERK à l'état basal ce qui met en évidence une forte activité tyrosine phosphatase dans ces cellules. L'inhibition de cette activité phosphatase par le traitement au pervanadate a d'ailleurs permis une augmentation significative du taux de ERK1/2 phosphorylé. Cependant, ce traitement n'a eu aucun effet sur la sensibilité des cellules L1210 à l'ATP⁴⁻ indiquant une absence d'influence de l'activité tyrosine phosphatase de B220 sur les fonctions cellulaires de P2X7. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus précédemment par notre équipe, montrant que malgré des taux similairement élevés d'expression de l'isoforme RB de la tyrosine phosphatase CD45 dans les lymphocytes T CD8⁺ de phénotype naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} et effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high}, ces deux sous-types de lymphocytes T diffèrent pour leur sensibilité à l'ATP⁴⁻ [3]. Ces résultats suggèrent donc que l'expression constitutive de B220 à la membrane des lymphocytes T L1210 n'est pas responsable de la perte des fonctions cellulaires associées à la stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻ (Hutteau-Hamel et al., soumis pour publication). Il est important de souligner que chez l'Homme comme chez la souris, l'expression de B220 à la membrane plasmique des lymphocytes T est observée lorsqu'ils reçoivent un signal d'apoptose, en particulier par la voie Fas/FasL [402, 403]. Il reste à

démontrer si la phosphatase B220 est impliquée dans les voies de signalisation de mort des lymphocytes T effecteurs ou bien s'il est seulement est une conséquence de l'initiation de l'apoptose car les lymphocytes T pathologiques DN B220⁺ des souris MRL/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO présentent un défaut de mort par apoptose. De même, les lymphocytes T B220⁺ de la lignée L1210 sont incapable d'induire une apoptose complète en présence d'ATP⁴⁻ (Hutteau-Hamel et al.,) ou par d'autres inducteurs de mort comme l'arsenic [404]. À l'inverse, les lymphocytes T de la lignée EL4 qui sont très sensible à la mort cellulaire dépendantes de P2X7 ou de l'arsenic n'expriment B220 qu'après l'initiation de l'apoptose [404].

La présence de B220 à la membrane des lymphocytes T pathologiques des souris MRL/*lpr* ne permettant pas d'expliquer la perte de fonction de P2X7, nous avons recherché d'autres paramètres biologiques pouvant expliquer l'altération fonctionnelle observée entre les lymphocytes T des lignées EL4 et L1210 et responsable de l'apparition de syndrome auto-immuns de sévérité très variable entre les animaux porteurs de la mutation *lpr* du gène *fas* dans les fonds génétiques B6 et MRL. Le fond MRL au sein duquel est apparu spontanément la mutation *lpr* du gène *fas* est complexe car issu de croisement successifs entre les lignées de souris suivantes : LG, AKR, C3H, et B6. Une des caractéristiques héritées des souris LG est la grande taille des souris MRL associée à une forte présence de graisse viscérale et une sensibilité à l'obésité. Les souris MRL présentent en effet une masse corporelle 2 à 3 fois plus importante que celle des souris B6 à l'âge adulte (50 à 60 g contre environ 20 g), suggérant des différences métaboliques importantes entre ces deux lignées de souris. De plus, il a été montré que les lymphocytes T auto-immuns des souris MRL/*lpr* et des patients lupiques présentent une agrégation plus importante des radeaux lipidiques à la membrane plasmique, suggérant une altération du métabolisme cellulaire du cholestérol. Plus spécifiquement, il a été montré que la dérégulation de la signalisation TCR observée chez les patients lupiques découlent de l'agrégation des radeaux lipidiques influencée par l'augmentation du taux de cholestérol membranaire [168]. D'autre part, différentes publications suggèrent une influence du cholestérol membranaire sur les fonctions cellulaires dépendantes de la voie P2X7/ATP⁴⁻. Ces résultats, bien qu'intéressant, ne peuvent pas être complètement extrapolés à tous les modèles cellulaires car mis en évidence dans des modèles artificiels comme des protéoliposomes [347] ou peu physiologiques car ayant perdu l'expression constitutive de P2X7. Ainsi, dans des cellules HEK transfectées par un plasmide codant pour des récepteurs P2X7 humains et murins

l'amplitude des réponses cellulaires induites par l'activation de P2X7 est augmentée par une déplétion membranaire en cholestérol par un traitement avec la MBCD [405]. Il faut cependant noter qu'un traitement par la MBCD est connu pour entraîner une désagrégation des radeaux lipidiques ce qui suggère que le taux de cholestérol ne régule pas à lui seul les fonctions cellulaires induites par le récepteur P2X7. En effet, de nombreuses publications présentent des résultats contradictoires. Il a par exemple été montré que l'expression de P2X7 à la membrane plasmique est dépendant son adressage au sein des radeaux lipidiques par une étape de palmitoylation. La dépalmitoylation de P2X7 permettra ensuite sa sortie des radeaux lipidiques [354]. Cependant, cette étude ne s'est pas intéressée à la fonctionnalité du récepteur P2X7 en lien avec sa localisation membranaire. Une autre étude a confirmé que l'inhibition de la palmitoylation par le bromopalmitate entraîne une perte d'expression membranaire de P2X7 dans des transfectant de type HEK mais de façon surprenante ses auteurs affirment qu'une déplétion en cholestérol membranaire par un traitement avec la MBCD permet de restaurer partiellement la capacité de ces cellules à former un pore non sélectif. Ces résultats semblent cependant discutables puisqu'ils suggèrent qu'une déplétion en cholestérol membranaire permet un retour de l'adressage de P2X7 à la membrane [405]. Enfin, la palmitoylation du récepteur P2X7 est également responsable de son incapacité à désensibiliser en réponse à une stimulation par l'ATP⁴⁻ comme cela a été récemment montré par cryo-microscopie électronique [355]. Cette absence de désensibilisation, caractéristique de l'isoforme P2X7, est essentielle à l'ouverture du pore non sélectif, l'activation des métalloprotéases, l'externalisation des PS et la mort cellulaire. Or, comme discuté précédemment, la palmitoylation est responsable de la localisation de P2X7 au sein des radeaux lipidiques, domaines membranaires enrichis en cholestérol, ce qui semble contradictoire avec les études suggérant un effet inhibiteur du cholestérol sur les fonctions cellulaires de P2X7. Ces publications ne permettant pas d'apporter de conclusion définitive sur l'influence du cholestérol et des radeaux lipidiques sur la sensibilité de P2X7 à l'ATP⁴⁻, nous avons étudié l'influence de ces différents paramètres membranaires sur les fonctions cellulaires de P2X7 dans des modèles qui nous semblent moins artificiels et mieux caractérisés d'un point de vue physiopathologique. Nous avons donc quantifié, en lien avec les différences de sensibilités de P2X7 à l'ATP⁴⁻, les taux de cholestérol et de gangliosides GM1 à la membrane plasmique des lignées lymphocytaires T EL4 et L1210 ainsi que des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ naïves, effecteurs et mémoires de souris normales,

lupiques et rendues obèses. Les résultats obtenus nous ont amené à évaluer l'impact de la localisation membranaire de P2X7 dans ou hors des radeaux lipidiques sur sa sensibilité à l'ATP⁴⁻. De façon intéressante, nous avons effectivement montré que les lymphocytes T peu répondeurs à l'ATP⁴⁻ comme les cellules de la lignée L1210, mais aussi les sous types de lymphocytes T CD4⁺ mémoires centraux CD44^{high}CD45RB^{high} et CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{hi}CD45RB^{hi} présentent des taux significativement plus élevés de cholestérol membranaire et de gangliosides GM1 que les lymphocytes T les plus sensibles comme la lignée lymphocytaire T EL4 ou les lymphocytes T CD4⁺ naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} ou effecteurs CD44^{high}CD45RB^{low}. De plus, les lymphocytes T de la lignée L1210 présentent une forte concentration en protéine et plus particulièrement en récepteur P2X7 au sein des domaines membranaires résistants aux détergents que sont les radeaux lipidiques. Il est important de noter que cette étude ne peut malheureusement pas être étendue dans les différentes sous populations lymphocytaires T provenant de souris B6, B6/*lpr*, MRL/*lpr* et les souris B6 et B6/*lpr* rendues obèses car cela implique une purification préalable de tous ces types cellulaires en nombre suffisant et sans altérer l'intégrité de leur membrane plasmique.

La déplétion du cholestérol membranaire des lymphocytes T L1210 par la MBCD permet de d'augmenter la sensibilité de leur récepteur P2X7 à l'ATP⁴⁻ et ainsi induire les fonctions cellulaires de P2X7 (ouverture du canal cationique et formation du pore non sélectif) suite à une stimulation par 500 μM d'ATP⁴⁻. Il serait intéressant de quantifier l'augmentation de la sensibilité du récepteur P2X7 (EC₅₀) par une expérience d'effet dose (200-2000 μM ATP⁴⁻) après traitement par la MBCD. Cet effet est bien associé à P2X7 puisqu'il n'est pas observé lorsque les cellules sont prétraitées par son inhibiteur spécifique A438079. De plus, cet effet est réversible et les fonctions cellulaires associées à P2X7 sont de nouveau perdues après rechargement en cholestérol de la membrane des lymphocytes T de la lignée L1210. À l'inverse, il est possible de drastiquement réduire la sensibilité à l'ATP⁴⁻ des lymphocytes T EL4 par l'augmentation de leur taux de cholestérol membranaire puis de restaurer leur sensibilité initiale en rétablissant leur taux basal en cholestérol membranaire. De façon inattendue cette restauration des fonctions n'est que partielle pour la capacité d'ouverture du canal calcique, contrairement à la capacité de formation du pore. De façon intéressante on observe que le taux de gangliosides GM1 à la membrane des cellules des lignées EL4 et L1210 n'est pas affecté par le traitement par la MBCD seul ou complexée au cholestérol ce qui suggère que les gangliosides

GM1 ne sont pas directement impliqués dans la régulation des fonctions cellulaires de P2X7. L'absence d'effet de la MBCD sur la viabilité cellulaire et l'intégrité de la membrane plasmique a été vérifié en traitant les lymphocytes T EL4 et L1210 au cours d'acquisition en cytométrie de flux ainsi qu'au cours d'expérience de mesure des flux calciques par spectrofluorométrie. Ainsi, le prétraitement par la MBCD n'a pas impacté en cytométrie en flux les paramètres physiques des cellules, en particulier leur taille (FSC) et la complexité de leur cytoplasme (granularité, SSC). De même, l'analyse en temps réel des flux calciques a montré que si le traitement par la MBCD entraîne la mise en place transitoire d'un influx calcique, les cellules restent capables de réguler leur homéostasie calcique. Des méthodes plus physiologiques que l'extraction chimique du cholestérol par la MBCD ont également été utilisées pour moduler les taux de cholestérol à la membrane plasmique. Nous avons ainsi cultivé les lignées lymphocytaires T EL4 et L1210 dans un milieu supplémenté en SVF délipidé afin de limiter l'apport exogène de lipides ou en présence de statines, des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, afin de réduire la production endogène de cholestérol. Malgré un effet négatif assez marqué sur la capacité proliférative des cellules traitées, nous avons pu observer que ces traitements permettent une réduction significative des taux de cholestérol membranaire et une mise en place de la capacité des lymphocytes T L1210 à former le pore non sélectif en réponse à 500 μM d'ATP. Confirmant de nouveau l'impact du cholestérol membranaire sur les fonctions cellulaires de P2X7. Pour déterminer la localisation membranaire de P2X7, en lien avec sa sensibilité à l'ATP⁴⁻, des lysats cellulaires de lymphocytes T EL4 et L1210 ont été soumis à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose afin d'isoler les fractions DRM, regroupant les radeaux lipidiques, et les fractions non-DRM. Ces différentes fractions ont ensuite été analysées pour la présence de P2X7 par western blot. Une première expérience a permis d'obtenir des résultats suggérant qu'une plus forte proportion de P2X7 est localisée dans les rafts des cellules L1210 comparée aux cellules EL4. Cependant, ces fractions non-DRM comprenaient l'ensemble des protéines cytosoliques rendant difficile l'étude de la répartition membranaire de P2X7 dans ou hors des radeaux lipidiques. En conséquence, l'expérience a été renouvelée après biotinylation des protéines de surfaces et leur purification sur billes de neutravidin ce qui a permis de considérablement enrichir les fractions en protéines membranaires et de s'affranchir des protéines cytosoliques. Les cellules EL4 présentent une majorité de P2X7 hors des radeaux lipidiques (fractions non-DRM) et une forte sensibilité à l'ATP⁴⁻. Après enrichissement de la membrane de ces cellules en cholestérol, une augmentation significative des taux de P2X7 est observée au sein des radeaux

lipidiques (fractions DRM). De façon intéressante, le profil de localisation de P2X7 obtenu par l'analyse en western blot est similaire entre les lymphocytes T EL4 dont la membrane a été chargée en cholestérol et les lymphocytes T L1210 non traités ce qui est à la fois cohérent avec les quantifications des taux de cholestérol membranaire et de protéines totales ainsi qu'avec les modifications de leur sensibilité à l'ATP⁴⁻. Cependant, la restauration du taux basal en cholestérol des lymphocytes T EL4 n'entraîne qu'un retour partiel de la localisation membranaire de P2X7 hors des radeaux lipidiques ce qui pourrait d'ailleurs expliquer que les fonctions canal et pore induites par l'activation de P2X7 n'ont pas été complètement rétablies dans les lymphocytes T EL4 traités par les complexes MBCD/Cholestérol puis par la MBCD seule. De façon inattendue par rapport aux résultats observés dans la lignée EL4, la déplétion en cholestérol des lymphocytes T L1210 semble moins impacter la localisation membranaire de P2X7 même si l'on observe un changement de profil en western blot entre les conditions traitées et non traitées par la MBCD. De plus, la restauration du taux basal en cholestérol membranaire dans la lignée L1210 n'a que peu d'effet sur la répartition de P2X7 dans ou hors des radeaux lipidiques. Ces résultats suggèrent, de façon inattendue par rapport à notre hypothèse de départ ainsi que les données de la bibliographie, que l'impact sur les fonctions cellules induites par P2X7 de l'enrichissement ou de la déplétion en cholestérol membranaire est indépendant ou seulement partiellement dépendant de sa localisation dans ou hors des radeaux lipidiques.

De façon satisfaisante car cohérente avec ce que nous avons observé dans la lignée lymphocytaire EL4, une augmentation *ex vivo* des taux de cholestérol des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de souris normales B6, par un traitement avec des complexes MBCD/Cholestérol, entraîne une réduction de la capacité de formation du pore non sélectif après stimulation de P2X7. Il est important de noter que les taux de GM1 membranaires ne sont pas impactés par le traitement par les complexes MBCD/cholestérol. Ces résultats soulèvent la question de l'influence des gangliosides GM1 sur la sensibilité de P2X7 à l'ATP⁴⁻ puisqu'ils semblent aller à l'encontre de la corrélation observée entre les forts taux de GM1 et les faibles sensibilités des lymphocytes T L1210 et CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high}. De façon plus surprenante encore, la capacité d'activation des métalloprotéases responsables du clivage de CD62L n'est pas réduite par l'enrichissement de la membrane en cholestérol alors que la formation du pore est significativement moins efficace. De plus, au cours d'une autre série

d'expériences sur des splénocytes de souris normales, l'enrichissement *ex vivo* en cholestérol de la membrane à cette fois entraîné une diminution du clivage de CD62L. Nous n'avons pas, à l'heure actuelle, d'explications à ces différences et de nouvelles expériences seront effectuées pour tenter de clarifier ce point. D'autre part, de façon inattendue, le traitement par la MBCD seule, censé réduire les taux de cholestérol membranaire, n'a dans cette expérience pas permis d'améliorer la sensibilité de P2X7 à l'ATP⁴⁻ et cela quel que soit la sous-population lymphocytaire étudiée. Cette absence d'effet est probablement due à la présence d'un grand nombre d'érythrocytes dans la suspension de cellules spléniques et qui n'ont pas été éliminés avant nos expérimentations pour éviter la libération massive d'ATP⁴⁻ et une activation non spécifique de P2X7. En effet, les érythrocytes présentent un taux très important de cholestérol à leur membrane qui assure leur rigidité membranaire. Le cholestérol membranaire des érythrocytes a donc pu entraîner la saturation des molécules de MBCD lors du traitement de la suspension de splénocytes. Cependant, nos résultats ont permis de montrer que le taux de cholestérol membranaire des lymphocytes T de souris impacte négativement la capacité de formation du pore non sélectif en réponse à une stimulation de P2X7 par l'ATP⁴⁻. Cet effet d'inhibition est d'ailleurs plus marqué dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} dont le taux de cholestérol membranaire est le plus faible et qui présentent les plus fortes capacités de formation du pore comparées aux sous populations lymphocytaires T effectrices et mémoires.

Afin d'établir le lien entre d'éventuelles dérégulations métaboliques entraînant une augmentation du cholestérol circulant, comme ce qui est observé dans la souris lupique MRL/*lpr*, et les taux de cholestérol membranaire, nous avons évalué la capacité d'un apport de cholestérol exogène à influencer les taux de cholestérol et de gangliosides GM1 membranaires et à impacter les fonctions cellulaires de P2X7 des sous populations lymphocytaires T. Nous avons ainsi soumis des souris normales B6 à une diète enrichie en lipides et en cholestérol pendant 16 ou 24 semaines. À l'issue de la période de diète, au cours de laquelle le poids des souris a été suivi, les animaux ont été testés pour leur taux de cholestérol et de triglycérides circulants ainsi que pour le développement d'une résistance au glucose et à l'insuline. Ces souris ont atteint un poids moyen d'environ 40 grammes après 16 semaines de régime et 50 grammes après 24 semaines de régime contre environ 20 grammes pour les souris nourries par un régime normal. De plus, ces souris ont acquis une résistance à l'insuline et au glucose ainsi

qu'un taux de cholestérol circulant environ 2 fois supérieur à celui des souris contrôles ce qui atteste de la dérégulation métabolique provoquée par ce régime. De façon intéressante, et en accord avec l'inflammation chronique existant chez les individus obèses, la diète a également entraîné une augmentation des proportions de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs ou mémoires au dépend des lymphocytes T naïfs. Ces modifications phénotypiques sont bien dépendantes de la diète puisque les souris contrôles et soumises à la diète ont été élevées et maintenues dans des conditions antigéniques similaires. De plus, la diminution des populations naïves et l'augmentation des populations effectrices sont plus significativement marquées après 24 que 16 semaines de traitement. En plus des modifications phénotypiques, la période de diète a induit des différences significatives de fonctionnalité de P2X7. On observe ainsi une diminution de la capacité des lymphocytes T à former le pore non sélectif et à cliver CD62L dès 16 semaines de diète. De façon intéressante et en accord avec les résultats obtenus dans les lymphocytes T traités par le complexe MBCD/Cholestérol, la diète de 16 semaines ne permet pas de moduler significativement les taux de GM1 membranaires. On observe à l'inverse, lorsque la diète est prolongée jusqu'à 24 semaines, une augmentation de 10 à 15% des taux de GM1 membranaires en plus de la réduction significative de la capacité de formation du pore et de clivage de CD62L. Cette inhibition fonctionnelle est spécifique du chargement de la membrane en cholestérol puisqu'elle présente le même profil d'inhibition que dans les splénocytes de souris recevant un régime normal et dont la membrane a été chargée *ex vivo* en cholestérol par des complexes MBCD/Cholestérol. On observe également que la formation du pore est plus sensible à l'inhibition par le cholestérol que le clivage de CD62L ce qui suggère à nouveau des différences dans la régulation par le cholestérol de ces deux fonctions cellulaires. Enfin, afin d'évaluer l'influence dans les lymphocytes T du taux de cholestérol et de GM1 membranaire sur la mort induite par P2X7 nous avons mesuré la capacité d'externalisation des PS et d'induction de la mort cellulaire en réponse à une stimulation par l'ATP⁴⁻. Nous avons ainsi pu observer que l'ensemble des sous populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ sont plus réfractaires à l'externalisation des PS et à la mort cellulaire induite par l'ATP⁴⁻ après 24 semaines de diète enrichie en cholestérol y compris les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires de phénotype CD44^{high}CD45RB^{high} présentant la plus forte résistance initiale à la mort cellulaire induite par la voie P2X7/ATP⁴⁻. Ces résultats sont tout particulièrement intéressants car ces lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high} ont été identifiés par notre équipe comme les précurseurs des lymphocytes T pathologiques DN B220⁺ des souris MRL/lpr

et B6/*lpr*-P2X7KO (Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, *Front. Immunol.*, 2022).

L'ensemble de ces résultats met en évidence l'influence du taux de cholestérol membranaire et de la localisation de P2X7, dans ou hors les radeaux lipidiques, sur ses fonctions cellulaires dans les lignées lymphocytaires T et les lymphocytes T *ex vivo*. De plus, l'induction d'obésité par une diète chez des souris B6 nous a permis de montrer que le taux de cholestérol circulant, apporté par la nutrition, influence le taux de cholestérol membranaire des lymphocytes T. Enfin, l'inhibition des capacités fonctionnelles de P2X7 à la membrane des lymphocytes T des souris obèses, suggèrent un lien entre le taux de cholestérol circulant et la perte des fonctions cellulaires de P2X7 après stimulation par l'ATP⁴⁻.

Afin de déterminer si l'augmentation des taux de cholestérol circulants et membranaires par un apport exogène peut entraîner une inhibition de P2X7 suffisamment importante pour aggraver la pathologie lupique modérée de la souris B6/*lpr*, comme nous l'avons observé dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO (Mellouk, Hutteau-Hamel et al., P2X7 purinergic receptor plays a critical role in maintaining T-cell homeostasis and preventing lupus pathogenesis, *Front. Immunol.*, 2022). Ainsi, des souris B6/*lpr* sont actuellement soumises à une diète de 24 semaines au cours de laquelle des prélèvements sanguins réguliers ainsi qu'un suivi clinique par scoring sont réalisés. Les souris B6/*lpr*-P2X7KO ne présentant pas de dimorphisme sexuel dans la sévérité de la pathologie auto-immune, contrairement aux souris MRL/*lpr*, nous avons inclus dans cette étude des souris B6/*lpr* mâles et femelles afin d'évaluer leurs éventuelles différences de sensibilité à des dérégulations métaboliques. À l'issue de la période de diète, les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) ainsi que les organes cibles des atteintes auto-immunes (reins, poumons et foie) seront prélevés et les différents paramètres cliniques du lupus des souris MRL/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO tels que l'accumulation massive de lymphocytes T DN B220⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires ou les infiltrations tissulaires seront évalués par cytométrie en flux et par des études d'anatomopathologie. De plus, les sérums prélevés au cours de la diète seront étudiés par ELISA multiplex afin de rechercher un éventuel déséquilibre de la balance cytokinique. Ces résultats nous permettront de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse selon laquelle les taux de cholestérol circulant et par conséquent les taux de cholestérol membranaire peuvent

influencer l'homéostasie des lymphocytes T et la sévérité des pathologies auto-immunes de type lupique via leur effet inhibiteur des fonctions cellulaires induites par l'activation de P2X7.

VII. Travaux en collaboration

Functional cooperation of the hedgehog and androgen signalling pathways during developmental and repairing myelination

Yousra Laouarem, Abdelmoumen Kassoussi, Amina Zahaf, Tom Hutteau-Hamel, Amine Mellouk, Pierre Bobé, Claudia Mattern, Michael Schumacher, Elisabeth Traiffort


Résumé :

Les voies Hedgehog de signalisation contrôlent les processus cellulaires fondamentaux au cours du développement et de la régénération des tissus. Dans le système nerveux central (SNC), la signalisation Hedgehog a été impliquée dans la production d'oligodendrocytes et de myéline, où elle fonctionne de manière concertée avec d'autres voies. Étant donné que le récepteur aux androgènes (AR) joue un rôle clé dans l'établissement du phénotype sexuel de la myéline au cours du développement et est nécessaire à la régénération spontanée de la myéline dans le SNC adulte, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une éventuelle coordination entre les signaux Hedgehog et androgènes dans la production d'oligodendrocytes et de myéline. Dans cette étude, nous rapportons des activités complémentaires des deux voies au cours de l'oligodendrogénèse post-natale précoce, révélant en outre que l'activation persistante de la signalisation Hedgehog entrave la production de myéline. Les données révèlent également une activité pro-myélinisante importante de la testostérone et l'implication de l'AR dans le contrôle de l'engagement des cellules souches neurales envers la lignée oligodendrogliale. Dans le contexte de la démyélinisation du SNC, nous fournissons des preuves de la coopération fonctionnelle des voies conduisant à l'accélération de la régénération de la myéline qui pourraient être liées à leur rôle respectif sur les réponses microgliales et astrogliales, une meilleure préservation de l'intégrité axonale, une neuroinflammation plus faible et une amélioration fonctionnelle de animaux dans un modèle immunitaire de démyélinisation du SNC. De fortes diminutions des cytokines délétères dans le SNC (GM-CSF, TNF- α , IL-17A) et la rate (IL-2, IFN- γ) constituent des caractéristiques uniques des médicaments combinés, tandis que la puissante activité thérapeutique de la testostérone sur le système immunitaire périphérique contribue à augmenter les cellules dendritiques CD11c⁺ tolérogènes, à réduire

l'expansion clonale des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels et à augmenter les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺. L'ensemble de ces données pourraient ouvrir des perspectives prometteuses pour les maladies démyélinisantes.

RESEARCH ARTICLE

Functional cooperation of the hedgehog and androgen signaling pathways during developmental and repairing myelination

Yousra Laouarem¹ | Abdelmoumen Kassoussi¹ | Amina Zahaf¹ |
 Tom Hutteau-Hamel² | Amine Mellouk² | Pierre Bobé² | Claudia Mattern^{3,4} |
 Michael Schumacher¹ | Elisabeth Traiffort¹ 

¹U1195 Inserm, University Paris-Saclay, Kremlin-Bicêtre, France

²UMR996 Inserm, University Paris-Saclay, Clamart, France

³M et P Pharma AG, Emmetten, Switzerland

⁴Oceanographic Center, Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, Florida

Correspondence

Elisabeth Traiffort, U1195 Inserm, University Paris-Saclay, Kremlin-Bicêtre, France.
 Email: elisabeth.traiffort@inserm.fr

Funding information

Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques, Grant/Award Numbers: RAK17128LLA, RAK19176LLA

Abstract

Hedgehog morphogens control fundamental cellular processes during tissue development and regeneration. In the central nervous system (CNS), Hedgehog signaling has been implicated in oligodendrocyte and myelin production, where it functions in a concerted manner with other pathways. Since androgen receptor (AR) plays a key role in establishing the sexual phenotype of myelin during development and is required for spontaneous myelin regeneration in the adult CNS, we hypothesized the existence of a possible coordination between Hedgehog and androgen signals in oligodendrocyte and myelin production. Here, we report complementary activities of both pathways during early postnatal oligodendrogenesis further revealing that persistent Hedgehog signaling activation impedes myelin production. The data also uncover prominent pro-myelinating activity of testosterone and involvement of AR in the control of neural stem cell commitment toward the oligodendroglial lineage. In the context of CNS demyelination, we provide evidence for the functional cooperation of the pathways leading to acceleration of myelin regeneration that might be related to their respective role on microglial and astroglial responses, higher preservation of axonal integrity, lower neuroinflammation, and functional improvement of animals in an immune model of CNS demyelination. Strong decreases of deleterious cytokines in the CNS (GM-CSF, TNF- α , IL-17A) and spleen (IL-2, IFN- γ) stand as unique features of the combined drugs while the potent therapeutic activity of testosterone on peripheral immune cells contributes to increase tolerogenic CD11c⁺ dendritic cells, reduce the clonal expansion of conventional CD4⁺ T cells and increase CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. Altogether, these data might open promising perspectives for demyelinating diseases.

KEYWORDS

androgen, cytokine, hedgehog signaling, microglia, myelination, oligodendrocyte, regulatory T cell



1 | INTRODUCTION

Hedgehog signaling constitutes one of the most important pathways that regulate fundamental cellular processes during embryonic and postnatal development, tissue regeneration and homeostasis. Considered as morphogens, Hedgehog proteins control the growth, differentiation, and migration of cells, thus orchestrating morphogenesis by triggering specific responses (Briscoe & Small, 2015; Ingham & McMahon, 2001; Matus, Magie, Pang, Martindale, & Thomsen, 2008). Hedgehog canonical signaling occurs when the glycoproteins Hedgehog bind and inactivate the 12-pass transmembrane protein Patched (Ptc). In the absence of its Hedgehog ligand, Ptc exerts a repressive activity on the seven-transmembrane protein Smoothed (Smo). Thus, Hedgehog binding relieves the inhibition exerted on Smo and leads to initiate a complex downstream signaling cascade. The latter results in the translocation of transcription factors of the Gli family into the nucleus and ultimately to the transcription of Hedgehog target genes (Kong, Siebold, & Rohatgi, 2019; Kopinke, Norris, & Mukhopadhyay, 2020; Niewiadomski et al., 2019).

In the central nervous system (CNS), the Hedgehog signaling pathway has been namely implicated in oligodendrocyte and myelin production during development and repair (Laouarem & Traiffort, 2018). Beyond its early role in the production of the first waves of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) that occur in the ventral part of the embryonic CNS (Traiffort, Zakaria, Laouarem, & Ferent, 2016), the pathway has been more recently implicated in the last wave of oligodendroglial cell production that takes place in the cerebral cortex during the perinatal period in rodents (Tong et al., 2015). Oligodendroglial cells arise from persistent germinal activity in the postnatal subventricular zone (SVZ), an extensive germinal layer on the walls of the lateral ventricle (Levison & Goldman, 1993; Luskin & McDermott, 1994; Menn et al., 2006). This last wave of oligodendroglial cell production plays a critical role since it coincides with the bulk of myelination occurring after birth (Azim, Berninger, & Raineteau, 2016; Kessarar et al., 2006; Naruse et al., 2016).

The Hedgehog pathway functions conspicuously in a concerted manner with other signaling pathways contributing to the cellular diversity required in a given tissue. The other signaling molecules namely include Wnt, BMP, and FGF, Notch or TGF β in numerous tissues (Durston, 2019; Sagner & Briscoe, 2019) and specially in the context of oligodendrogenesis (Azim et al., 2016). Because androgens and their main receptor, the androgen receptor (AR) play a key role in establishing the sexual phenotype of myelin in the developing brain (Abi Ghanem et al., 2017) and in spontaneous regeneration of myelin occurring upon a demyelinating event in the adult CNS (Bielecki et al., 2016), we hypothesized the existence of a possible coordination between the Hedgehog and androgen pathways in the context of oligodendrogenesis and myelin production. Indeed, we have previously shown the importance of postnatal androgens and brain AR in the sex differences that emerge during the early postnatal days and lead to a higher density of oligodendrocytes and to thicker myelin sheaths in the male mouse brain when compared with females (Abi Ghanem et al., 2017). In addition, we have reported that AR-mediated

androgen signaling favors astrocyte recruitment and subsequently spontaneous oligodendrocyte-mediated myelin regeneration in a model of focal CNS demyelination (Bielecki et al., 2016).

Here, we report stage-specific activities of the Hedgehog and androgen signaling pathways during early postnatal oligodendrogenesis and the existence of coordinated activities revealing most importantly that persistent activation of the canonical Hedgehog signaling impedes myelination. Moreover, we uncover the prominent pro-myelinating activity of testosterone as well as the involvement of the AR in the control of SVZ-derived neural stem cell (NSC) commitment, a yet unsuspected and nonreproductive function of AR in the early developing brain. In the context of CNS demyelination, we show that the activation of each signaling pathway unexpectedly induces both proliferation and differentiation of OPCs and that co-activation of the pathways results in accelerated myelin regeneration possibly related to their respective role on the response of microglia and astrocyte to demyelination. Furthermore, the functional cooperation of Hedgehog and androgen signals is not limited to myelin regeneration since it results in higher preservation of axon integrity, lower neuroinflammation and in a quite complete regression of neurological disabilities in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of CNS demyelination. From a molecular point of view, the combined drugs uniquely induce a strong decrease of deleterious cytokines including GM-CSF, TNF- α and IL-17A in the CNS, as well as IL-2 and IFN- γ in the spleen. Moreover, the potent activity of testosterone on peripheral immune cells contributes to increase tolerogenic CD11c⁺ dendritic cells, decrease the clonal expansion of conventional CD4⁺ T cells, and increase the proportion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Wild-type gonadally intact or castrated (for evaluation of hormone activity alone or in the presence of the Smo agonist SAG upon demyelination) C57Bl/6 male mice were purchased at the age of 8–12 weeks from Janvier Labs Breeding Center (France). For in vitro experiments, litters were obtained from timely mated C57Bl/6 females purchased from Janvier Labs Breeding Center or from in-house bred. *Smo^{fl/fl}* (Long, Zhang, Karp, Yang, & McMahon, 2001), *AR^{fl/fl}* (Shiina et al., 2006), *Glast-CreER;CAG-GFP* (Mori et al., 2006) (kind gift from Dr. L. Dimou) and *Plp-EGFP* (Mallon, Shick, Kidd, & Macklin, 2002) were maintained on a C57Bl/6 background. The mouse strain CX3CR1tm2.1(Cre/ERT2) (thereafter called CX3CR1CreER-YFP) expressing the YFP reporter under the promoter of the chemokine receptor CX3CR1 (Wolf et al., 2013; Yona et al., 2013) was provided by Jackson Laboratory. All animals were housed in standard conditions: 12 hr light-dark cycle with food and water ad libitum. All procedures were performed according to the European Communities Council Directive (86/806/EEC) for the care and use of laboratory animals and were approved by the Regional Ethics

Committee CEEA26, Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement et de la Recherche.

2.2 | Drugs

The Smo agonist SAG and Smo antagonist SANT (Chen, Taipale, Young, Maiti, & Beachy, 2002) were purchased from D&C Chemicals (China). Testosterone was provided by Sigma-Aldrich (France). For *in vitro* experiments, SAG and SANT were dissolved in dimethyl sulfoxide (10 mM) and subsequently diluted in the culture medium. Testosterone was dissolved in ethanol (10 mM) and then diluted in the culture medium. For *in vivo* administration per oral route: 15 mg/kg SAG dissolved in 0.5% methylcellulose/0.2% Tween80; 250 µg/kg fadrozole provided by Sigma-Aldrich (France) was dissolved in dimethyl sulfoxide and diluted in water. Testosterone (0.2 mg/day under a volume of 2.5 µl in each nostril) and estradiol (0.05 mg/day under a volume of 2.5 µl in each nostril) were administered per the intranasal route via a proprietary oleogel (MetP Pharma AG, Emmetten, Switzerland; Banks, Morley, Niehoff, & Mattern, 2009). For local administration of SAG (0.2 µM) together with LPC, the molecule was dissolved in dimethyl sulfoxide (10 mM). Tamoxifen (Sigma-Aldrich) was dissolved in corn oil (30 mg/ml), and 3 mg were daily administered per the oral route to the female from days 1 to 10 after birth of the pups.

2.3 | Neurosphere cultures

Neurospheres were prepared according to previously published protocol from P0 to P1 mouse pups (Marshall 2nd et al., 2008). Briefly, after removal of the brain from the skull, a coronal block (2 mm in thickness) was performed in the area between the rhinal fissure and the hippocampus. Then, parasagittal cuts lateral to the lateral ventricles as well as a horizontal one to remove the tissue above the corpus callosum were performed and leaved a small chunk of tissue surrounding the lateral ventricles containing a high density of NSCs. Tissue was incubated in trypsin-EDTA solution at 37°C for 5 min, triturated by using Pasteur pipettes. Three volumes of DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum were added. The cells were centrifuged and washed twice in fresh medium. 60,000 cells were placed in 6 ml fresh medium supplemented with growth factors including EGF and bFGF. Cells were finally distributed at a final density of 1,000 cells/cm². Fresh growth factors were added every 2–3 days. Neurospheres became visible under phase optics after 7–10 days.

2.4 | In vivo treatment of early postnatal pups

P5 male pups were subcutaneously treated with the appropriate drugs used alone or in association under a 20 µl volume every other day. The Smo modulators were used at the concentration of 20 µg/g of pup weight. Then, 20 µg of testosterone and 0.250 µg/g of fadrozole were used for each administration. At P10, the pups were deeply

anesthetized, perfused with PFA 4%. The brain was removed, post-fixed in PFA 4%, and cryopreserved in sucrose 30% before freezing and cryostat sectioning (14 µm).

2.5 | Primary mixed glial cell cultures

Primary glial cell cultures were prepared from the dorsal telencephalon of newborn P1 male mice as previously described (Feutz, Pham-Dinh, Allinquant, Miehe, & Ghandour, 2001). At 5 days *in vitro* (DIV), the culture medium was replaced by a fresh medium supplemented with the drugs at the appropriate concentrations or the vehicle. The supplemented culture medium was replaced every other day with a fresh solution. At 12 DIV, the cells were fixed before the appropriate immunostaining labeling. The analysis of three independent cultures was performed for each condition.

2.6 | LPC-induced focal demyelination

Demyelinating lesions were induced unilaterally by stereotaxic injections of 1.5 µl of a solution containing LPC 1% (Sigma-Aldrich) into the right corpus callosum at the following coordinates (to the bregma): anteroposterior (AP) +1 mm, lateral +1 mm, dorsoventral (DV) –2.2 mm for brain analyses performed at 3, 7, or 10 days postlesion (dpl) after animal perfusion with PFA 4%. For analysis of SAG effect alone at 2 and 7 dpl the drug (0.2 µM) was co-injected with LPC. The tissue was post-fixed for 4 hr in fresh 4% PFA solution before being cryopreserved in 30% sucrose, frozen in liquid nitrogen, and cryostat sectioned (14 µm).

2.7 | Autoimmune experimental encephalomyelitis

Castrated male mice at age of 9–10 weeks were maintained for 1 week for acclimatization prior to EAE. The pathology was induced by subcutaneous injection of an emulsion of MOG_{35–55} peptide in complete Freund's adjuvant as previously described (Terry, Ifergan, & Miller, 2016). The mice that developed EAE were randomly assigned into vehicle, SAG, testosterone or SAG-testosterone treatment in order to constitute groups with similar time of EAE onset and similar onset scores ($n = 7$ animals per group). The mice were scored blindly once a day starting at Day 7 postimmunization until Day 30 according to the following scale: 0.0 = no obvious changes in motor function; 0.5 = tip of tail is limp; 1.0 = limp tail; 1.5 = limp tail and hind leg inhibition; 2.0 = limp tail and weakness of hind legs or signs of head tilting; 2.5 = limp tail and dragging of hind legs or signs of head tilting; 3.0 = limp tail and complete paralysis of hind legs or limb tail with paralysis of one front and one hind leg; 3.5 = limp tail and complete paralysis of hind legs and animal unable to right itself when placed on its side; 4.0 = limb tail, complete hind leg, and partial front leg paralysis with minimal moving and feeding. Drugs were administered at the onset of clinical symptoms until Day 30 after immunization. Testosterone was daily administered via the intranasal route. SAG was administered by gavage every other day. Each animal

received both oral gavage and intranasal administration containing the appropriate drug or vehicle according to the group the animal belongs to. The spinal cord/vertebrae was removed and lumbar spinal cord/vertebrae samples were either postfixed in PFA 4% for 24 hr and sectioned (7 μ m) with a microtome for immunostaining or postfixed in a mixture of PFA 2% and glutaraldehyde 2% for 5 days, then in cacodylate-buffered 1% osmium tetroxide for 1 hr at 4°C and in 2% uranyl acetate for 1 hr at room temperature before embedding in epoxy resin and ultrathin sectioning for electron microscopy.

2.8 | Immunostaining experiments

The primary antibodies were as follows: Olig2 (rabbit, mouse, 1:500, AB9610, MABN50, Millipore), MBP (rabbit, AB980, 1:1,000, Millipore), PLP (mouse, Mab388, 1:250, Millipore), Adenomatous Polyposis Coli (APC/CC1) (mouse, OP80, 1:500, Calbiochem), BrdU (rat, Ab6326, 1:500, Abcam), GFAP (Rabbit, ZO334, 1:1,000, Dako; mouse, G3893, 1:1,000, Sigma), Iba1 (rabbit, W1 W019-19741, 1:500, Wako), Arg-1 (goat, sc-18,355, 1:100, Santa-Cruz), PDGFR α (rat, 558,774, 1:500, BD Pharmingen), NF200 (chicken, CH22105, 1:1000, Neuromics), Ki67 (mouse, 550,609, 1:100, BD Pharmingen), GFP (chicken, Ab13970, 1:100, Abcam), Aromatase (rabbit, Ab18995, 1:200, Abcam). The secondary antibodies were: goat anti-rabbit cyanine 3 conjugated (111,165,003, 1/250, Jackson ImmunoResearch); goat anti-mouse Alexa 488 (A11029, 1:250, Thermo Fisher Scientific), goat anti-rabbit Alexa 633 (A21070, 1:750, Thermo Fisher Scientific), goat anti-rat Alexa 633 (A21094, 1:750, Thermo Fisher Scientific), goat anti-chicken Alexa 488 (Ab150169, 1:750, Abcam), goat anti-chicken Alexa 546 (A11040, 1:250, Thermo Fisher Scientific); donkey anti-goat Alexa 546 (A11056, 1:250, Thermo Fisher Scientific).

2.9 | Image acquisition and analysis

Images were taken using the microscope analyzing system Axiovision 4.2 (Carl Zeiss, Inc.), the confocal Zeiss LSM 510-Meta Confocor 2 and the scanner imager (Model Panoramic 250 Flash II Marque 3DHISTECH) with the CaseViewer software. Analyses were performed with ImageJ software. At least 10 sections per mouse were analyzed. For the brains derived from the LPC-injected animals, the immunofluorescent-positive cells or areas were determined in one every other five sections throughout the whole demyelinated lesion per mouse and averaged for each animal. The lesion surface was determined by measuring the area of the nuclear densification (correlated with myelin loss visualized by MBP or PLP staining) one every other five slices through the whole demyelinated lesion.

2.10 | Electron microscopy

Ultrathin sections of lumbar spinal cords were examined using transmission electron microscope (1,011 JEOL) equipped with a Gatan digital

camera. The g ratio (the ratio between the axon diameter and fiber diameter corresponding to myelin sheath + axon diameter) was estimated by measuring the minimum and maximum axon diameter and fiber diameter for each axon using the ImageJ software. At least 300 randomly chosen myelinated axons were evaluated for each animal.

2.11 | RT-qPCR analysis

At least four animals of each gender and age were sacrificed by decapitation. Dorsal telencephalons were dissected and frozen in liquid nitrogen for further processing. Alternatively, mixed glial cells ($n = 3$) or neurospheres ($n = 2$) derived from 6-well culture plates were used. Total RNA was isolated by using the Trizol Technique (Thermo Fisher Scientific) and RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse Transcription was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was carried out by using the TaqMan Gene expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and gene expression was analyzed with the 7,300 Systems SDS Software (Applied Biosystems) normalized to reference genes GAPDH. TaqMan probes were as follows: GAPDH, Mm99999915_m1; MBP, Mm01266402_m1; Shh, Mm00436528_m1; Gli1, Mm00494654; AR, Mm00442688; Csf2, Mm01290062.

2.12 | Measurement of testosterone levels by GC-MS/MS

Blood was collected in heparinized plastic tubes and plasma was prepared. Forebrains were quickly dissected out and frozen on dry ice. Samples were stored at -20°C until steroid analysis by GC-MS/MS as previously described (Abi Ghanem et al., 2017; X. Zhu et al., 2017). Briefly, steroids were extracted from plasma and brain with methanol and 2 ng of $^{13}\text{C}_3$ -testosterone (Isoscience, PA) were added to the extracts as an internal standard for quantification. Samples were purified and fractionated by solid-phase extraction. The unconjugated steroid-containing fraction was then further purified and fractionated by HPLC. The fraction containing testosterone was derivatized with heptafluorobutyric anhydride (HFBA). The GC-MS/MS analysis of brain extracts was performed using an AI 1310 autosampler, a Trace 1,310 gas chromatograph (GC), and a TSQ 8000 tandem mass spectrometer (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific San Jose, CA) according an analytical protocol previously validated (Abi Ghanem et al., 2017; X. Zhu et al., 2017).

2.13 | Flow cytometry

Lymph node cell suspensions were phenotyped by flow cytometry using fluorescent-conjugated monoclonal antibodies (mAb) directed against the cell surface markers CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), B220 (clone RA3-6B2), CD45RB (clone C363.16A), CD4 (clone GK1.5), CD8 α (clone 53-6.7), CD44 (clone IM7), Ly6G (clone RB6-8C5),

F4/80 (clone BM8), NK1.1 (clone PK 136), CD11c (clone N418), and the transcription factors Foxp3 (clone FJK-16s), T-bet (clone eBio4B10) and ROR- γ T (clone B2D) (eBioscience Thermo Fisher Scientific or BD Biosciences, France). Use of mAb to mouse Fc γ receptor (clone 93, eBioscience Thermo Fisher Scientific) avoided nonspecific antibody binding. Data acquisition was performed at the Flow cytometry core facility at IPSIT, Université Paris-Saclay, INSERM, CNRS (Clamart, France). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

2.14 | Quantification of cytokines

Levels of IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, GM-CSF, IFN- γ , and TNF- α were assayed using the Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 8-plex Assay (Bio Rad M60000007A) and the Bio-Plex Pro Mouse Cytokine IL-17A Set (Bio Rad 171G5013M) according to the manufacturers' instructions in both spinal cord and spleen lysates containing the same amounts of proteins quantified via the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher). Data acquisition were performed on a Luminex MAG-PIX System.

2.15 | Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 7.0 software (La Jolla, CA). The significance of differences between means was evaluated by the Student's unpaired *t* test two-tailed for two independent group comparisons and ANOVA followed by Tukey's post tests for comparisons of more than two groups and/or several variables. In case of absence of distribution normality, nonparametric tests (Mann-Whitney two-tailed, Kruskal-Wallis with Dunn's post tests for comparison) were used. Appropriate corrections were done according to the determination of the variance of each sample. The values are the means \pm SEM from the number of animals indicated in each plotted graph or as indicated in the corresponding legends. Significance of $p < .05$ was used for all analyses. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p < .0001$.

3 | RESULTS

3.1 | Smo- and AR-mediated signals act at distinct steps upstream OPC generation in the germinative zone of the dorsal forebrain

We examined whether Smo- and AR-mediated signals already influence in a concerted manner the neonatal generation of OPCs from NSCs located in the germinative zone of the dorsal forebrain. In this aim, we first showed Smo and AR transcription in neurospheres derived from the dorsal forebrain of early postnatal (P0–P1) mouse pups (Figure S1). Then, we genetically induced the removal of each receptor in Glast-expressing NSCs by using Glast-CreERT2;Smo^{fl/fl};

CAG-green fluorescent protein (GFP), and Glast-CreERT2;AR^{fl/fl}; CAG-GFP mouse strains. Cre-mediated recombination was triggered by treating the nursing females daily with tamoxifen to inactivate Smo or AR, starting at postnatal day 1 (P1) until P10, when brains from male pups were taken and analyzed. Smo removal was associated with a collapse in the number of NSCs and their progeny, Olig2⁺ GFAP⁻ oligodendroglial cells and Olig2⁺ GFAP⁺ astrocytes, visualized by the GFP reporter (Figure 1a–f). In contrast, AR removal did not modify the density of GFP⁺ cells, but reduced the proportion of newly generated oligodendroglial cells in favor of astrocytes (Figure 1g–l) indicating that AR did not influence the generation/maintenance of NSCs, but importantly promoted their commitment toward the oligodendroglial fate. These results show that Hedgehog and androgen signaling induce distinct effects on SVZ-derived NSCs. Whereas Smo activation is required for the maintenance of NSCs, AR signaling directs NSC differentiation toward OPCs and oligodendrocytes.

3.2 | Hedgehog signaling activation impedes developmental myelination induced by testosterone in vivo

Whereas SVZ-derived gliogenic Olig2⁺ progenitors give rise to oligodendroglial cells and astrocytes during the first postnatal days (Marshall, Novitch, & Goldman, 2005), OPCs actively proliferate until P5 and then differentiate into mature oligodendrocytes giving rise to myelinated fibers after P5. To address the significance of Smo and AR signaling and their potential interactions during this stage of developmental myelination, we injected every other day male mouse pups with the Smo agonist SAG (20 μ g/g), the Smo antagonist SANT (20 μ g/g), and testosterone (20 μ g) from P5 to P10, when the brains were analyzed.

SAG-treated animals displayed an increased density of PDGFR α ⁺ OPCs compared with the control condition (30.3 \pm 2.7 vs. 20.6 \pm 0.9 cells/0.1 mm², $p < .0028$; Figure 2a–d), whereas SANT highly increased the density of Olig2⁺ CC1⁺ differentiated oligodendrocytes compared with the control (65.0 \pm 3.1 vs. 47.5 \pm 2.6% of Olig2⁺ cells co-expressing CC1, $p = .0046$; Figure 2e,f). Activation and blockade of Smo-mediated Hedgehog signaling thus appeared to control the balance between OPCs and differentiated oligodendrocytes. Testosterone was ineffective in modulating the densities of OPCs and CC1-expressing oligodendrocytes. In contrast, the hormone significantly expanded the production of myelin sheaths around axons suggesting its critical role for the maturation of oligodendrocytes into myelinating cells compared with the control (78.0 \pm 4.1 vs. 60.1 \pm 2.0% of NF200⁺ axon area co-expressing MBP, $p = .0043$; Figure 2g,h). As expected from their effects on the balance between OPC and oligodendrocyte densities, SAG (46.4 \pm 1.9, $p = .04$) and SANT (77.7 \pm 3.2, $p = .0052$) decreased and increased the percentage of myelinated fibers, respectively, compared to the control (Figure 2g, h). In addition, SAG blocked testosterone-mediated increase in the percentage of MBP⁺ fibers (50.4 \pm 3.4, $p < .0001$ compared to testosterone effect), whereas the combination of SANT and testosterone amplified the promyelinating effect associated with each of them

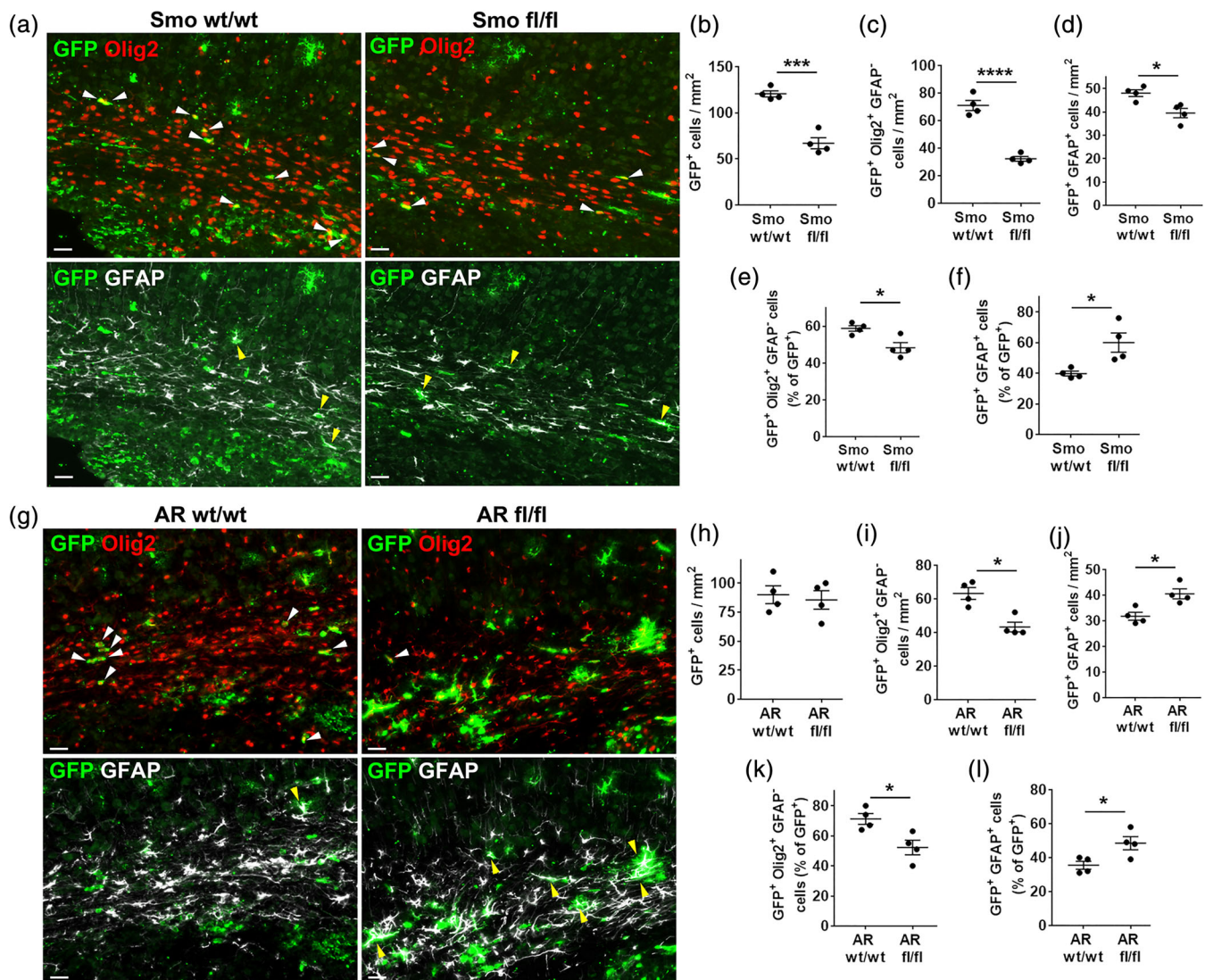


FIGURE 1 Smo and AR differently control the generation of OPCs arising from the subventricular zone-derived neural stem cells. (a) Brain slices derived from tamoxifen-treated *Glast-CreERT2;Smo^{fl/fl};CAG-GFP P10* mouse pups were analyzed by immunofluorescence staining directed to GFP (labeling of *Glast*⁺ astrocyte-like NSCs and their progeny), Olig2 (labeling of the glial progeny of NSCs), and GFAP (labeling of the astroglial progeny). (b–f) Quantifications indicate a drop in the total number of GFP⁺ cells and a consistent decrease in the density of newly generated OPCs and to a lesser extent astrocytes. (g) Brain slices derived from tamoxifen-treated *Glast-CreERT2;AR^{fl/fl};CAG-GFP P10* mouse pups analyzed by immunofluorescence staining directed to GFP, Olig2, and GFAP. (h–l) Quantification of the number of GFP⁺ cells in the developing corpus callosum shows a significant decrease in the density of newly produced GFP⁺ Olig2⁺ GFAP⁻ OPCs in favor of newly produced GFP⁺ Olig2⁻ GFAP⁺ astrocytes. The values are the means \pm SEM from the number of animals indicated in the plotted graphs. *, $p < .05$; ***, $p < .001$; ****, $p < .0001$ versus the control condition. Scale bars: 50 μ m [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

(86.1 ± 3.0 ; $p < .0001$ compared to the control; Figure 2h). Moreover, since estrogens are known to play an important role in brain development as shown for the regulation of neurite outgrowth in male hippocampal neurons (Ruiz-Palmero et al., 2016), we investigated whether testosterone effect on axon myelination could be due to its conversion to estrogens via aromatase. We detected discrete aromatase staining in the early postnatal corpus callosum and cerebral cortex from P5 male pups, mostly observed in sparse cell bodies and in a few cell processes in agreement with the staining previously reported at a higher level in developing neurons at P0 (Sellers et al., 2020). Co-immunostaining with the Olig2 marker revealed no double labeled

cells and aromatase immunoreactivity appeared still much more reduced in P8 brain (Figure S2a). Moreover, we treated male pups with testosterone every other day in the presence or absence of the aromatase inhibitor fadrozole and found comparable levels of myelination as indicated by the similar increase in MBP/NF200 ratio in testosterone (74.1 ± 2.2 ; $p = .027$) and testosterone+fadrozole (74.8 ± 1.6 ; $p = .026$) conditions compared to the controls (63.8 ± 2.4 ; Figure S2b,c). As a whole, these data indicated that aromatase expression is not temporally correlated with the maturation of oligodendrocytes and that myelination of axons induced by testosterone does not require its aromatase-mediated conversion.

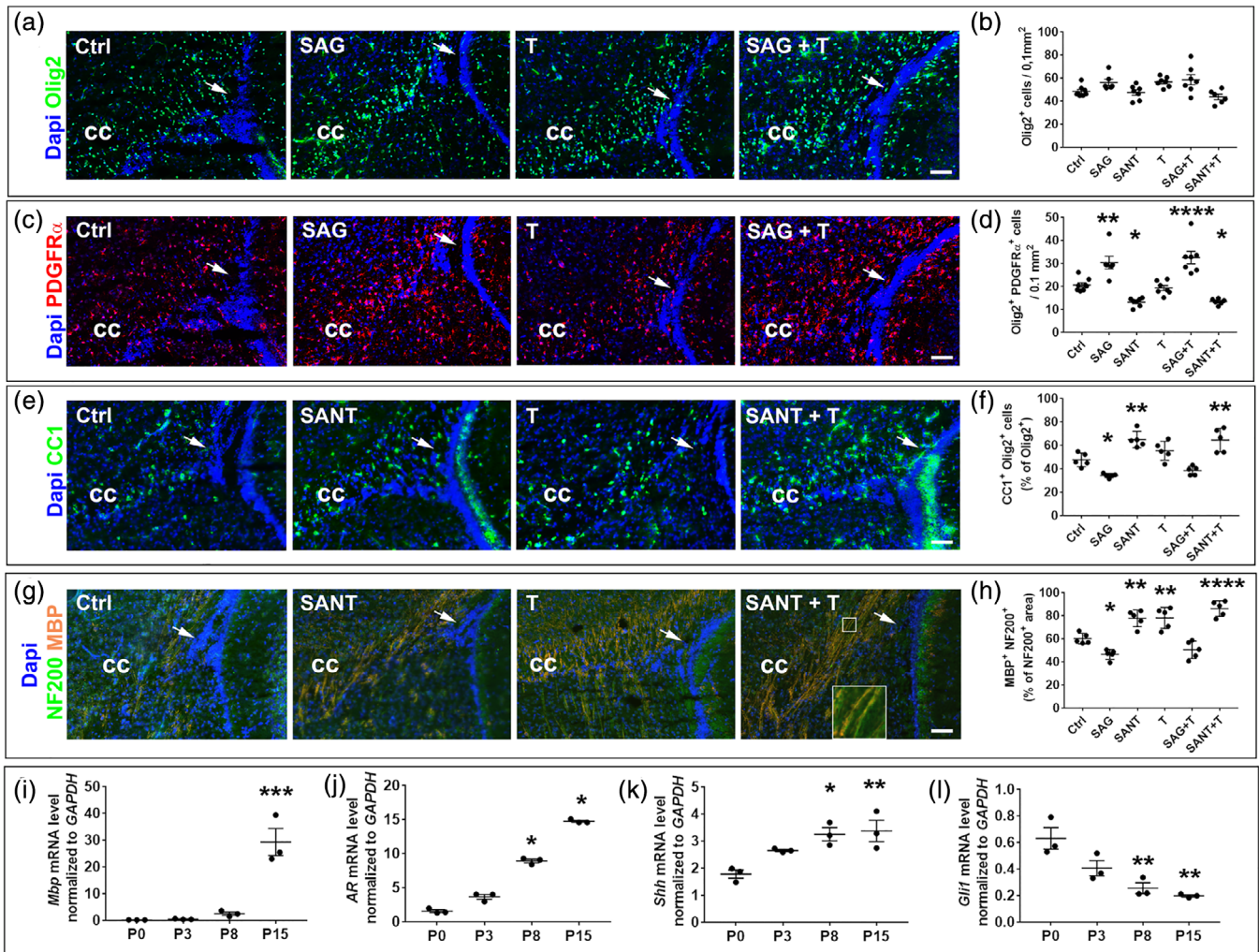


FIGURE 2 Smo-mediated Hedgehog signaling is a potent inducer of OPC proliferation able to block the pro-myelinating activity of androgens during developmental myelination. (a–h) Immunostaining of brain slices performed at the level of the germinative area (white arrow) and adjacent corpus callosum (cc) of postnatal day 10 (P10) pups treated with the drug vehicle (control, Ctrl), the Smo agonist SAG, the Smo antagonist SANT, and the steroid hormone testosterone (T) administered alone or in combination. Newly generated glial cells (a,b), OPCs (c,d), mature oligodendrocytes (e,f), and oligodendrocytes able to myelinate NF200⁺ axons (g,h) are labeled by Olig2, PDGFR α , CC1, and MBP markers, respectively. Scale bars: 50 μ m. The boxed area in (g) is magnified in the inset. Quantifications are expressed per surface unit or in percentage of total Olig2⁺ cells or total area occupied by axons, respectively. (i–l) Kinetics of the relative expression of transcripts encoding MBP, the main receptor mediating androgen signaling AR, the secreted protein Shh and Gli1 transcription factor determined by quantitative RT-PCR in the dorsal forebrain from mouse pups aged of 0, 3, 8, and 15 days. Values are the means \pm SEM from the number of animals indicated in the plotted graphs. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$; ****, $p < .0001$ versus the control condition [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

In order to address the physiological relevance of the above results, we compared the expression profiles of the transcripts encoding MBP, the AR, the secreted protein Sonic Hedgehog (Shh) and its main effector Gli1 in the dorsal forebrain from birth to P15, that is, the period encompassing the neonatal wave of oligodendrocyte and myelin production (Kessaris et al., 2006). MBP and AR expression concomitantly increased in agreement with the above suggested involvement of testosterone in the maturation of oligodendrocytes and myelination (Figure 2i,j). Remarkably, although Shh slightly increased before reaching a plateau from P8 onward, Gli1 progressively decreased (Figure 2k,l). Altogether, these data suggested the existence of coordinated activities between Hedgehog and testosterone signaling in controlling developmental myelination, the

impairment of myelinating cell production when Hedgehog signaling remains activated and the role of testosterone in oligodendrocyte maturation and myelin formation without requiring its aromatase-mediated conversion into estrogens.

3.3 | In vitro pharmacological co-modulation of the hedgehog and androgen signaling pathways mimics in vivo effects during oligodendrocyte differentiation

The impairment of myelinating cell production when Hedgehog signaling is activated and the role of active androgen signaling in the progression of oligodendrocytes toward myelinating cells were



demonstrated in intact postnatal male mouse pups, at a developmental stage when endogenous brain androgen levels are increased (Abi Ghanem et al., 2017). We thus studied the existence of such coordinated activities in a more controlled environment by using primary mixed glial cell cultures prepared from the dorsal forebrain of newborn P1 male pups. After 5 days *in vitro* (DIV), cultures were supplemented for 7 days with testosterone alone or in combination with the Smo agonist SAG or antagonist SANT before their analysis (Chen et al., 2002). Testosterone was used at the concentration of 1 μ M according to our previous work (Bielecki et al., 2016), and we used 1 μ M of SAG and 0.1 μ M of SANT according to their ability to regulate the transcription of the main effector of canonical Hedgehog signaling, Gli1 (Figure S3). We tested the effects of the different molecules used alone or in combination on OPC proliferation and differentiation.

Consistent with the increase in PDGFR α ⁺ OPCs observed *in vivo* and with the previously reported activity of Shh proteins on purified OPCs (Zakaria et al., 2019), SAG increased the number of Olig2⁺ OPCs incorporating the proliferation marker BrdU compared to the control (8.4 \pm 0.1 vs. 1.9 \pm 0.5% of Olig2⁺ cells co-expressing BrdU, $p < .003$; Figure 3a,b). SANT did not induce any detectable modulation of OPC proliferation. Testosterone was devoid of proliferative activity on Olig2⁺ cells (Figure 3a,b). In contrast, both SANT and testosterone strongly increased OPC differentiation into myelinating oligodendrocytes as shown by the increased proportion of PLP⁺ GFP⁺ oligodendrocytes expressing the myelin binding protein MBP (12.3 \pm 0.6 and 11.7 \pm 1.5% of PLP⁺ cells, for SANT and testosterone, respectively) compared to the control condition (3.2 \pm 0.3% of PLP⁺ cells, $p = .001$ and $p = .002$, respectively; Figure 3c,d). Moreover, supplementation of the culture medium with both SANT and testosterone led to an additive effect on the percentage of MBP⁺ oligodendrocytes compared with the control (22.6 \pm 2.1% of PLP⁺ cells, $p < .0001$). This effect was significantly different from the effects induced by SANT ($p = .0004$) or testosterone ($p = .0002$) used alone. Most importantly, SAG prevented the pro-differentiating effect of testosterone (7.5 \pm 0.6% of PLP⁺ cells), that became not significantly different from the control in the presence of SAG (Figure 3c,d). In order to investigate if a molecular crosstalk could be involved in the functional response specifically induced by SAG+T and SANT+T, we investigated the existence of a potential transcriptional regulation for several components of each pathway including the transcription factors of the Gli family (Gli1-3) known to transduce the canonical Hedgehog signal, the ligand-dependent transcription factor AR and the enzymes involved in testosterone production or metabolism including 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -hsd) and 5 α -reductases (5 α -Red), respectively. Besides the expected transcriptional regulation of Gli1 induced by SAG and SANT (Chen et al., 2002), no other significant modification was detected (Figure S4) suggesting that the functional response induced by SAG+T and SANT+T was not due to a molecular interaction at least at the level of the investigated genes. Altogether, these results provided further evidence that during developmental myelination, Smo-mediated signaling stimulates OPC proliferation,

whereas its downregulation is a prerequisite for testosterone to exert its promyelinating effects.

3.4 | SAG stimulates OPC proliferation and differentiation and regulates microglial polarization during myelin regeneration

The negative effect of SAG on the developmental maturation of oligodendrocytes into myelinating cells was unexpected as Shh signaling has been previously shown to be required for the regeneration of myelin (Ferent, Zimmer, Durbec, Ruat, & Traiffort, 2013). Therefore, we investigated the effect of SAG in repairing conditions by using the focal model of lyssolecithin (LPC)-induced demyelination of the corpus callosum that had allowed us to demonstrate the repairing effect of the recombinant Shh protein (Ferent et al., 2013). We co-injected LPC and SAG in the corpus callosum of adult male mice and first analyzed OPC proliferation 2 days postlesion (dpl). SAG induced a significant increase in the number (25 \pm 3 vs. 10 \pm 2 cells/ 0.1 mm², $p = .009$) and percentage of PDGFR α ⁺ OPCs co-expressing the Ki67 proliferation marker (PDGFR α ⁺ Ki67⁺ OPCs: 57 \pm 2 vs. PDGFR α ⁺ OPCs: 32 \pm 1%, $p = .0002$; Figure 4a,b). At 7 dpl, SAG increased not only the density (83 \pm 7 vs. 53 \pm 3 cells/0.1 mm², $p = .011$), but also the percentage of Olig2⁺ cells differentiated into CC1⁺ oligodendrocytes (53 \pm 3 vs. 43 \pm 1%, $p = .017$; Figure 4c,d). Thus, in contrast to developmental myelination, SAG is endowed with both proliferating and differentiating activity during myelin regeneration.

We had previously shown that major components of the Hedgehog pathway including Smo are upregulated in oligodendroglia, microglia and to a lesser extent in astrocytes during spontaneous remyelination after LPC-mediated demyelination (Ferent et al., 2013; Zakaria et al., 2019). Therefore, we immunostained slices by using Iba1 and Arg-1 as markers of the whole population of microglia and a cell subset endowed with a differentiating activity on OPCs, respectively (Lloyd & Miron, 2019; Miron et al., 2013). SAG did not modify the density of Iba1⁺ cells (171 \pm 17 vs. 176 \pm 7 cells/0.1 mm², $p = .763$), but significantly induced the percentage of these cells co-expressing Arg-1 (51 \pm 2 vs. 16 \pm 4, $p = .03$) compared to the control condition (Figure 4e,f). As expected from the low expression of Smo previously detected in astrocytes (Ferent et al., 2013), SAG did not modulate GFAP immunostaining (Figure S5). These data thus indicated that during oligodendrocyte regeneration, SAG is endowed with a dual activity targeting both OPCs and microglia, shifting the phenotype of the latter toward the expression of anti-inflammatory markers, consistent with the promotion of oligodendrocyte differentiation. During myelin regeneration, SAG may thus promote OPC differentiation indirectly via the control of microglia. Such a mechanism is further supported by the previous report that microglia polarized toward an anti-inflammatory phenotype drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination (Miron et al., 2013).

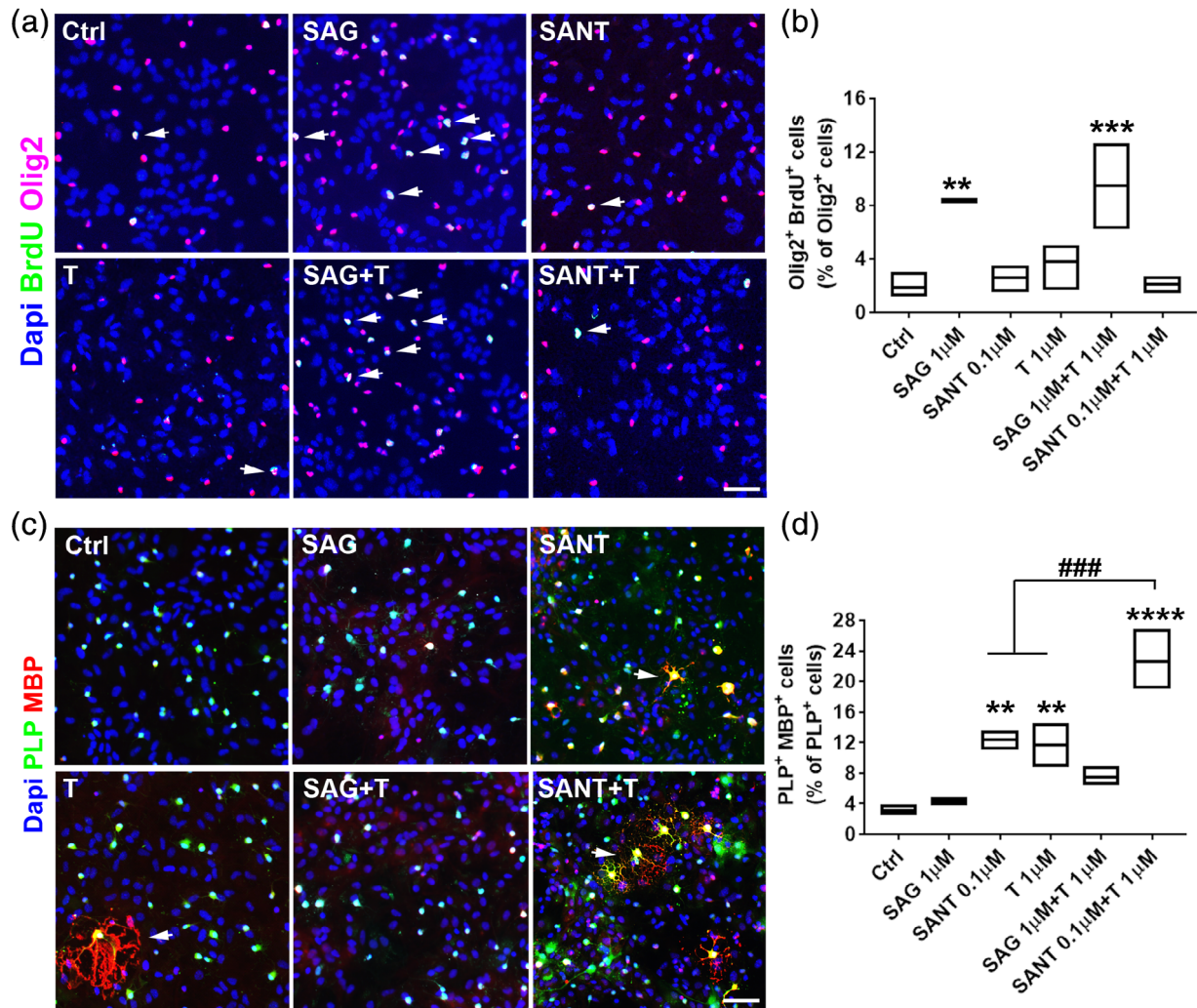


FIGURE 3 Hedgehog signaling activation or blockade modulate testosterone-mediated oligodendrocyte maturation in vitro. (a,b) Immunostaining and quantifications of Olig2⁺/BrdU⁺ proliferating oligodendroglial cells in a primary mixed glial cell culture maintained in the absence (control, Ctrl) or presence of the Smo agonist (SAG), the Smo antagonist (SANT) and testosterone (T) used alone or in association as indicated. (c,d) MBP immunostaining and quantification of a primary mixed glial cell culture derived from Plp-GFP mice and supplemented or not with the indicated drugs. The white arrows show double-labeled cells. Values are the means \pm SEM from $n = 3$ independent cultures performed in triplicates. The line is located at mean in the graphs. **, $p < .01$; ***, $p < .001$; ****, $p < .0001$ versus the control condition. ####, $p < .001$ versus the indicated condition. Scale bars: 50 μ m [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.5 | The spontaneous differentiation of OPCs occurring after CNS demyelination is reduced upon conditional removal of Smo in microglia

To corroborate a role of microglial Hedgehog signaling in OPC differentiation, we induced the genetic removal of Smo in CX3CR1-expressing microglia and analyzed tissue regeneration in the LPC model. Although Smo removal did not induce any modification in the density of the whole population of Iba1⁺ microglia in the lesion at 3 dpl (Figure 5a,b), it was associated with a marked decrease in the percentage of Iba1⁺ cells co-expressing Arg-1 (31 ± 4 vs. $7 \pm 3\%$ of Iba1⁺ area for wild-type and mutant animals, respectively, $p = .0045$; Figure 5a,c). Importantly, this reduction in Arg-1⁺ microglia was associated at 7 dpl with a significant decrease in the number (51.8 ± 3.5 vs. 35.8 ± 1.9 , $p = .0070$; Figure 5d,e) and percentage of CC1⁺

differentiated oligodendrocytes (44.8 ± 1.9 vs. 30.7 ± 1.0 , $p = .0006$; Figure 5d,f), consistent with the pro-differentiating activity previously attributed to the subset of microglia expressing anti-inflammatory markers such as Arg-1 (Miron et al., 2013). Smo expression in microglia is thus required in a cell autonomous manner for Arg-1 expression in those cells.

3.6 | SAG and testosterone combination results into accelerated myelin regeneration upon CNS demyelination

In gonadally intact adult males, that is in the presence of endogenous testosterone, SAG stimulated the proliferation, and importantly also the differentiation of OPCs into oligodendrocytes. To address the

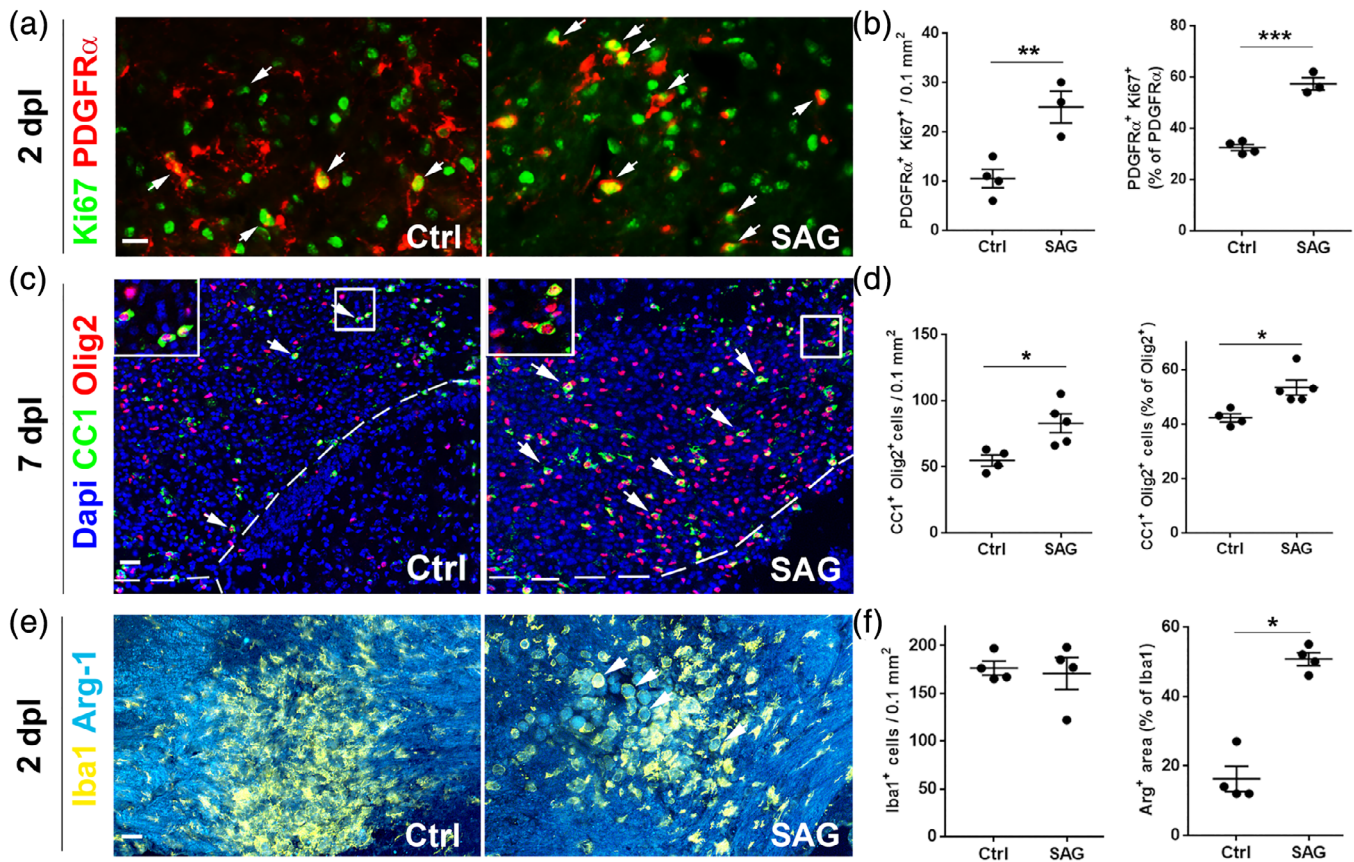


FIGURE 4 The Smo agonist SAG promotes both OPC proliferation and OPC differentiation upon demyelination. (a,b) PDGFR α ⁺ Ki67⁺ immunolabeling and quantification of the labeled cells in slices of the demyelinated corpus callosum derived from male mice that received a stereotaxic injection of LPC in the presence of SAG or the drug vehicle (Ctrl) and were analyzed at 2 days postlesion (dpi). The quantifications reflect PDGFR α ⁺ Ki67⁺ cells expressed per surface unit or in percentage of the total number of PDGFR α ⁺ OPCs in each group. The white arrows show proliferating OPCs. (c,d) Olig2⁺ CC1⁺ immunostaining and quantification of CC1⁺ Olig2⁺ differentiated oligodendrocytes expressed per surface unit or in percentage of total Olig2⁺ cells in the demyelinated corpus callosum from male mice that have received a stereotaxic injection of LPC in the presence of SAG or the drug vehicle (Ctrl) and were analyzed at 7 dpi. The arrows show Olig2⁺ oligodendroglial cells that co-express CC1. The dashed white lines in I delineate the border of the lesion. (e,f) Iba1⁺ Arg-1⁺ immunostaining and quantification of slices derived from animals described in (a). The quantifications reflect the total number of Iba1⁺ microglia and the percentage of those cells co-expressing the anti-inflammatory marker Arg-1. The white arrows show the precocious occurrence of double-labeled Iba1⁺ Arg-1⁺ cells in the presence of SAG. Scale bars (μ m): 25 (a), 50 (c,e). Data are the mean \pm SEM from the number of animals indicated in the plotted graphs. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$ versus the control condition [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

question of a potential functional cooperation between the Hedgehog and androgen pathways during myelin regeneration, we daily administered SAG and testosterone, alone or in combination, to castrated adult male mice after LPC-induced demyelination of the corpus callosum. SAG (15 mg/kg) was administered via the oral route as previously described (Singh, Singh, Gorantla, Poluektova, & Maggirwar, 2016). Testosterone was administered via the intranasal route (0.2 mg/day in 2.5 μ l oleogel) to preferentially target the brain (Banks et al., 2009).

We first verified the efficient entry of testosterone into the brain via the nasal route. Castrated males received intranasal vehicle or testosterone ($n = 5$ per group). Brains were sampled 2 hr later for the analysis of testosterone levels in brain and blood plasma by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS; Abi Ghanem et al., 2017). As expected, levels of testosterone were close

to the limit of detection (about 1 pg) in the vehicle-treated castrated males. After intranasal administration, brain levels of testosterone reached high physiological concentrations that were nearly 10 times higher than in plasma (Brain: 20.9 \pm 2.5 ng/g; plasma: 2.7 \pm 0.4 ng/ml, $n = 5$, $p < .001$), consistent with a direct and privileged delivery of the hormone to the brain.

At 7 days after LPC-induced demyelination of the corpus callosum, the time point encompassing the end of OPC proliferation and the beginning of their differentiation, we observed that testosterone and SAG administered separately (24.6 \pm 1.8 and 25.8 \pm 1.1 cells/0.1 mm², respectively) or in combination (24.2 \pm 2.4) increased the number of PDGFR α ⁺Ki67⁺ proliferating OPCs compared to the control condition (14.8 \pm 0.6, $p = .0045$; Figure 6a,c). Similarly, the total number of PDGFR α ⁺ OPCs was increased in the demyelinated area by testosterone and SAG used alone or in association (69.6 \pm 0.9,

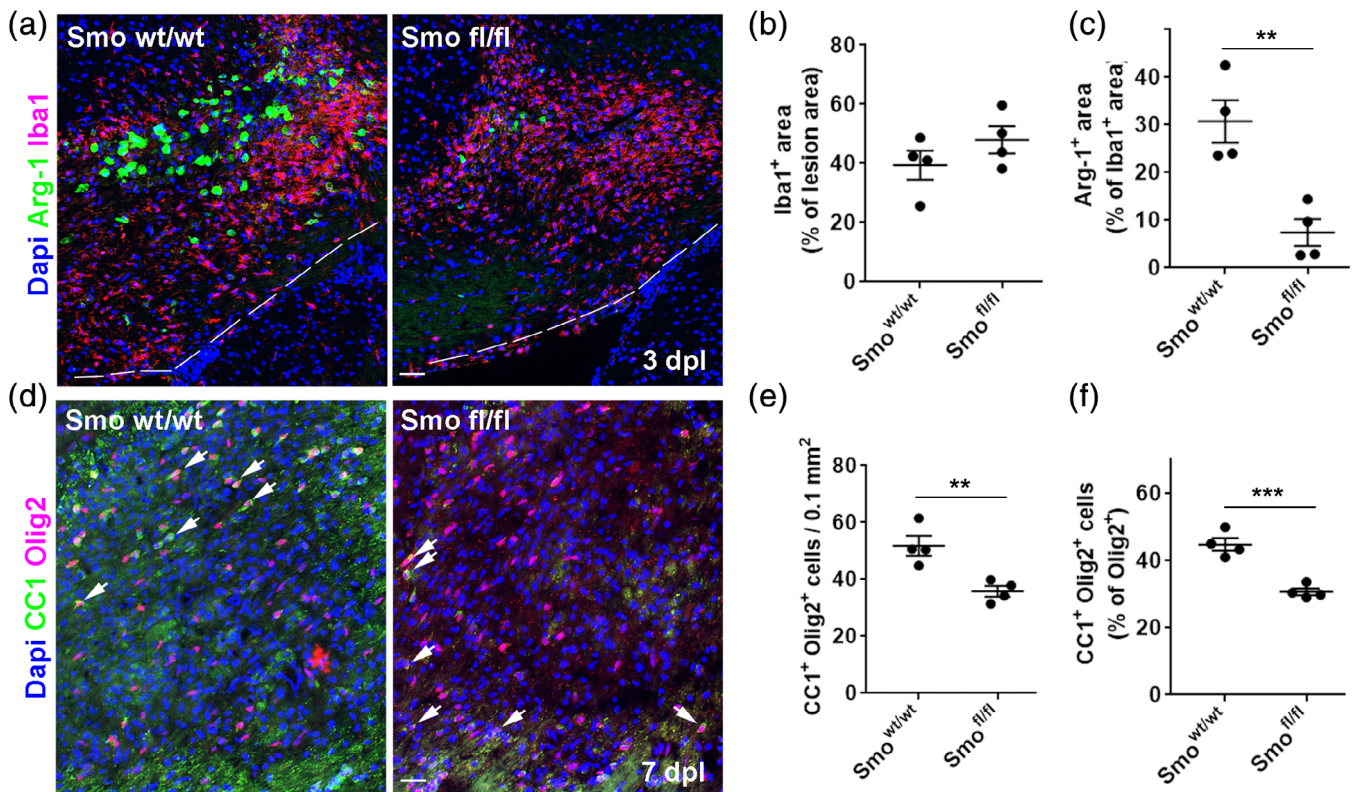


FIGURE 5 Smo removal in microglia reduces Arg-1 expression and the ability of OPCs to differentiate into mature oligodendrocytes upon LPC-induced demyelination. Slices derived from Smo^{wt/wt};CX3CR1^{CreERT2/+}-YFP (Smo wt/wt), and Smo^{fl/fl};CX3CR1^{CreERT2/+}-YFP (Smo fl/fl) animals demyelinated by LPC injection into the corpus callosum, were immunostained at 3 (a–c) or 7 (d–f) dpl for visualizing and quantifying Iba⁺ microglia and its Arg-1⁺ phenotype (a–c) or CC1⁺ Olig2⁺ differentiated oligodendrocytes (d–f). The white dashed lines delineate the dorsal border of the lateral ventricle in (a). The white arrows show double labeled cells in (d). **, $p < .01$; ***, $p < .001$ versus the control condition. Scale bars (μm): 100 (a,d) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

73.6 \pm 3.4, and 70.4 \pm 6.9 cells /0.1 mm², respectively) compared to the control (50.0 \pm 1.3, $p = .0091$; Figure 6a,b). At 10 dpl, the time point when differentiated oligodendrocytes reach a maximal density and start to mature into myelinating cells, drugs administered separately or in combination were found to increase the density of differentiated Olig2⁺CC1⁺ oligodendrocytes (155 \pm 17, 153 \pm 9, 169 \pm 8 cells/0.1 mm², respectively) compared to the control (67 \pm 4, $p = .0006$; Figure 6d,f). Moreover, the percentage of differentiated oligodendrocytes was significantly higher after administration of the combined drugs (89 \pm 1 cells/0.1 mm²) than after separate administration of testosterone or SAG (76 \pm 2 and 75 \pm 3, respectively) compared to the control (64 \pm 1, $p = .0002$; Figure 6d,g). The total density of Olig2⁺ oligodendroglial cells was similarly increased in each condition (203 \pm 18, 207 \pm 20, and 190 \pm 8, respectively) compared to the control (106 \pm 6, $p = .0033$; Figure 6d,e) thus indicating that the differentiating effects of SAG and testosterone converged toward a substantial acceleration of OPC differentiation. In agreement with this observation, expression of the proteolipid protein, one of the proteins comprising myelin, was highly detected in testosterone-, SAG- or SAG + T-treated animals again at a significantly higher level in the last condition (39 \pm 1, 40 \pm 1, and 49 \pm 3) whereas it was observed at a much lower level in the controls (23 \pm 2, $p < .0001$; Figure 6h,i).

Therefore, while SAG and testosterone, respectively stimulate OPC proliferation and differentiation during development, they promote both processes during myelin regeneration in the adult brain. SAG and testosterone-induced remyelination thus only partially recapitulate developmental myelination. Importantly, the combination of the drugs leads to a higher remyelination potential in the adult brain.

3.7 | Aromatase-mediated conversion of testosterone to estradiol is involved in OPC differentiation

Since we have previously related the dual proliferative et differentiative activity of SAG to its effects on two different cell types (OPCs and microglia), we also wondered how testosterone could promote both OPC proliferation and differentiation. We have previously shown that the AR plays an important role in myelin regeneration. This was demonstrated by the conditional invalidation of AR in the CNS (Bielecki et al., 2016; Hussain et al., 2013). Other studies demonstrated a role of estrogen receptors during remyelination, pointing to an additional role of the aromatization of testosterone to estradiol (Karim et al., 2019; Voskuhl et al., 2019). Within the male brain,

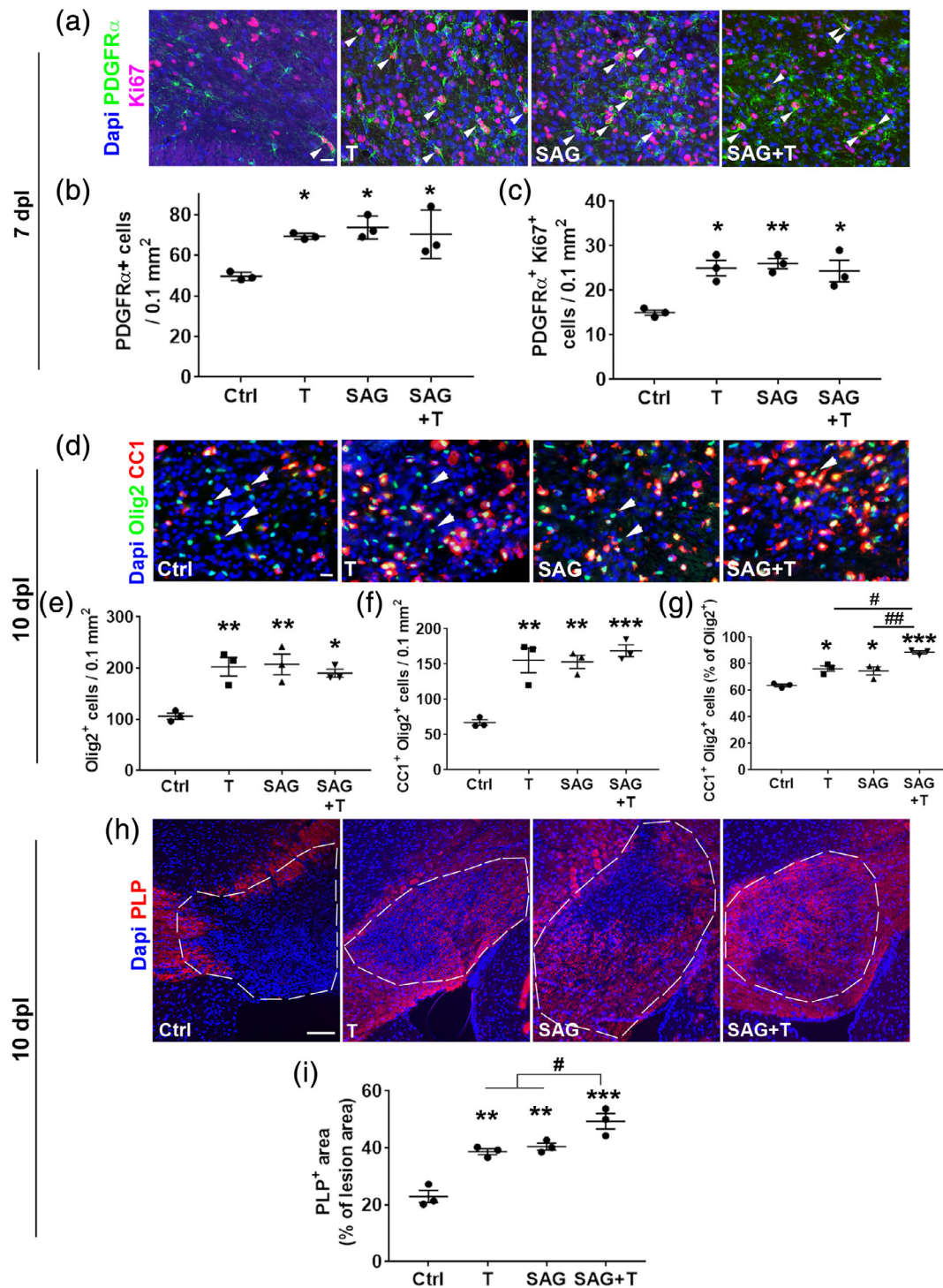


FIGURE 6 The combined administration of SAG and testosterone accelerates oligodendrocyte differentiation and maturation upon LPC-mediated demyelination. (a–c) PDGFR α + Ki67+ immunolabeling and quantification of the labeled cells in slices of the demyelinated corpus callosum derived from male mice that received a stereotaxic injection of LPC and were then systemically treated for 7 days with the drug vehicle (Ctrl), SAG, testosterone (T), or SAG+T combination. The quantifications indicate total PDGFR α + (b) and PDGFR α + Ki67+ cells (c) in each treated group. The white arrowheads show proliferating OPCs. (d–g) Olig2+ CC1+ immunostaining and quantification of total Olig2+ oligodendroglial cells and CC1+ Olig2+ differentiated oligodendrocytes per surface unit (f) or in percentage of total Olig2+ cells (g) in the demyelinated corpus callosum from male mice that have received a stereotaxic injection of LPC and were then systemically treated for 10 days with the indicated drugs. The arrowheads show Olig2+ oligodendroglial cells that do not express CC1. (h,i) PLP staining and quantification in the demyelinated corpus callosum from 10 dpi animals treated as indicated above. The dashed white lines delineate the lesion area. Scale bars (μ m): 25 (a,d), 100 (h). Data are the mean \pm SEM from the number of animals indicated in the plotted graphs. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$ versus the control condition. #, $p < .05$; ##, $p < .01$ versus the indicated condition [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

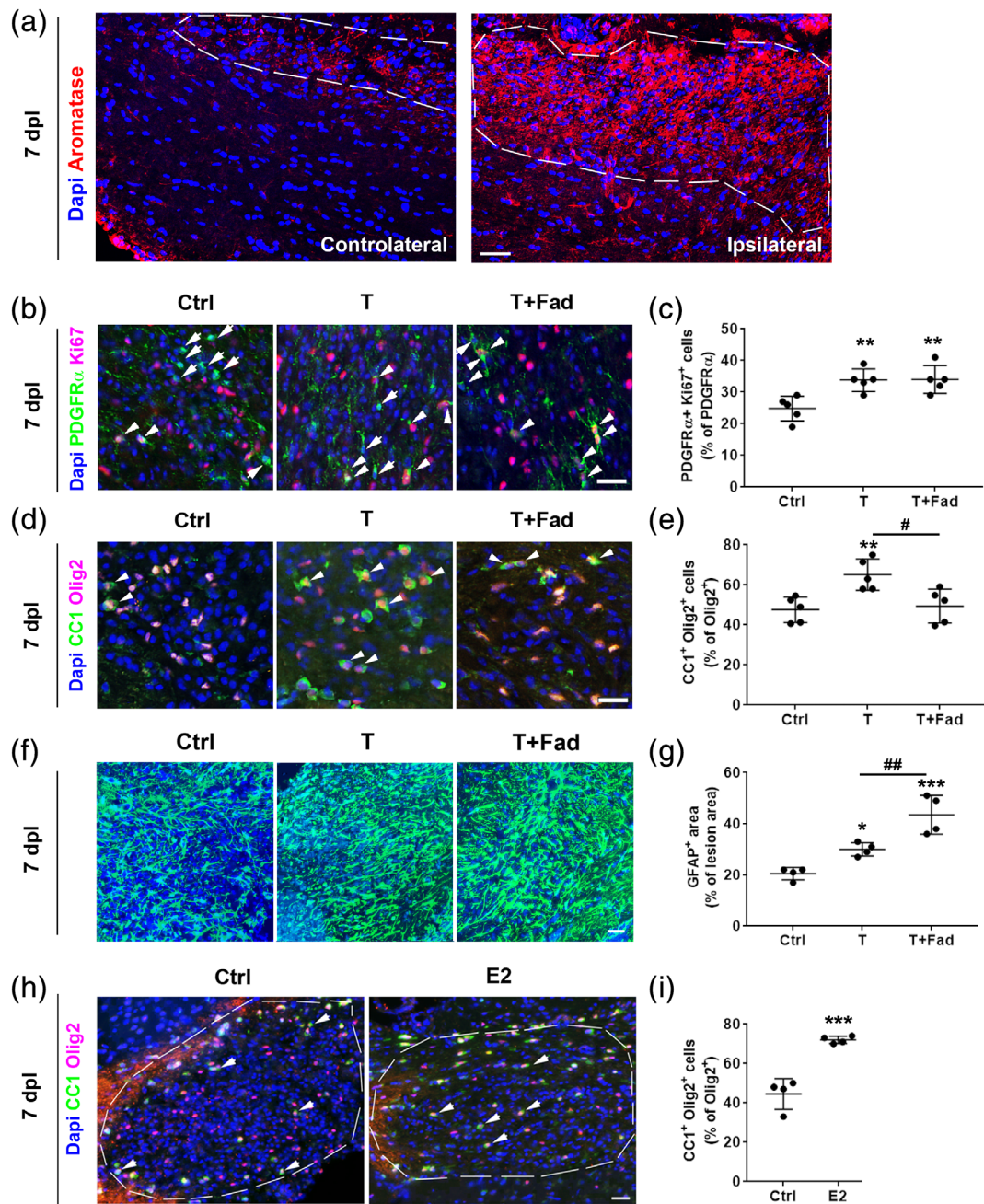


FIGURE 7 Aromatase-mediated conversion of testosterone account for its dual activity on OPC proliferation and oligodendrocyte differentiation. (a) Aromatase immunostaining of brain slices derived from animals demyelinated via the stereotaxic injection of LPC into the right corpus callosum analyzed at 7 dpl. The white dashed line delineates the lesion performed in the ipsilateral side and extending into the contralateral side. (b–e) Immunostaining of brain sections derived from animals demyelinated via the stereotaxic injection of LPC into the corpus callosum and daily treated per the intranasal route for 7 dpl with either the drug vehicle (Ctrl) or testosterone (T), in the presence or absence of a daily oral administration of the aromatase inhibitor fadrozole (Fad). The arrowheads show proliferating OPCs in (b) and differentiated oligodendrocytes in (d). The arrows indicate non proliferating OPCs in (b). Histograms in (c,e) correspond to the quantification of the percentage of Pdgfr α + Ki67+ proliferating OPCs and the percentage of Olig2+ cells co-expressing CC1. (f,g) GFAP immunostaining was also evaluated within the lesion area in the same groups of animals. (h,i) Olig2 and CC1 immunostaining of slices derived from LPC-demyelinated animals daily treated with estradiol (E2) for 7 dpl per the intranasal route. Quantification of the percentage of Olig2+ oligodendroglial cells differentiated into CC1+ oligodendrocytes is shown in (g). The white dashed lines and the white arrows in (h) delineate the lesion area and double-labeled cells, respectively. The values are the means \pm SEM from the number of animals indicated in the plotted graphs. **, $p < .01$; ***, $p < .001$ versus the control condition. #, $p < .05$, ##, $p < .05$ versus the indicated condition. Scale bars: 50 μ m [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



testosterone is indeed converted by the aromatase enzyme to estradiol, which mediates neuroprotective signaling (Arevalo et al., 2012). Interestingly, in the LPC-induced demyelinating lesion at 7 dpl, we observed a strong increase in aromatase expression (Figure 7a).

To address the role of the aromatase in the dual actions of testosterone, the stimulation of OPC proliferation and differentiation, we used again the selective aromatase inhibitor fadrozole. Testosterone was again administered daily via the intranasal route in the presence or absence of oral fadrozole used at the dose (0.25 mg/kg) based on previous studies (Trainor, Lin, Finy, Rowland, & Nelson, 2007). Treatments started on the day after the stereotaxic injection of LPC. At 7 dpl, testosterone increased the percentage of PDGFR α ⁺ Ki67⁺ proliferating OPCs (33 ± 2 , $p = .01$ and 34 ± 2 , $p = .009$) compared to the control ($25 \pm 2\%$; Figure 7b,c), and its proliferating effect was not prevented by fadrozole, pointing to an androgen-dependent effect. In contrast, fadrozole blocked the increase in the percentage of CC1⁺ differentiated oligodendrocytes induced by testosterone (49 ± 4 vs. 65 ± 3 , $p = .02$; Figure 7d,e), suggesting that OPC differentiation is an aromatase-dependent effect. In accordance with this interpretation, the intranasal administration of estradiol (0.05 mg/day in 2.5 μ l oleogel) to castrated LPC-demyelinated male mice during 7 days indeed increased the differentiation of OPCs into CC1⁺ oligodendrocytes (72 ± 1 vs. 45 ± 4 , $p = .0005$; Figure 7h,i). In the same line, since we have previously shown that testosterone significantly increased GFAP immunostaining in the lesion in the LPC-induced demyelination of the spinal cord (Bielecki et al., 2016), we investigated GFAP expression upon LPC-induced demyelination of the corpus callosum (Figure 7f,g). Testosterone in the absence (30.0 ± 1.3 , $p = .05$) or in the presence (43.5 ± 3.8 , $p = .0002$) of fadrozole increased significantly GFAP labeling in the demyelinated area compared to the vehicle (20.5 ± 1.2). The value determined for testosterone in the presence of fadrozole was remarkably and significantly higher than the value found for testosterone alone ($p = .0084$) suggesting that the higher amount of testosterone available in the presence of fadrozole led to a stronger effect on astrocytes. In contrast, testosterone modified neither Iba1 nor Arg-1 immunostainings (Figure S6). Thus, these data showed that testosterone itself induces the proliferation of OPCs and favors astrocyte reactivity, whereas its aromatase-mediated conversion is required for OPC differentiation into premyelinating oligodendrocytes.

3.8 | Functional cooperation between SAG and testosterone in the EAE model

Based on the cooperative effects reported above between SAG and testosterone toward a higher remyelination efficiency after LPC-induced demyelination, we investigated the existence of a potential cooperation between the Hedgehog and androgen pathways in EAE, considered as a translational model of multiple sclerosis. EAE was induced in adult castrated male mice by a subcutaneous injection of an emulsion of MOG₃₅₋₅₅ peptide in complete Freund's adjuvant as previously described (Terry et al., 2016). Mice developing EAE were

assigned to one of the four treatments: vehicle, intranasal testosterone (0.2 mg administered daily), oral SAG (15 mg/kg, administered by gavage every other day) and the combination of testosterone and SAG. Drug treatments started at the onset of neurological signs (Day 1), corresponding to a therapeutic rather than a preventive approach, and were administered until Day 30 after immunization, when spinal cords were sampled for histological analysis. During the experiment, mice were scored blindly according to commonly used EAE disease scale every day, starting at Day 7 until Day 30 postimmunization.

Vehicle-treated animals displayed the typical profile of disease progression with hindlimb paralysis reflected by a 3.0–3.5 clinical score reached by Day 6 and persisting until the end of the experiment. Animals receiving testosterone, SAG or their combination reached at most the 2.5 score by Days 3–4 and then displayed a notable and progressive reversion of motor disabilities. While SAG- and testosterone-treated animals reached more or less a plateau from days 8 to 20 at scores close to 1.5, animals receiving the drug combination further decreased their disability scores until the range 0.5–1.0 from Day 11 onward (treatment: $F_{(3,480)} = 76.58$, $p < .0001$; time: $F_{(19,480)} = 3.08$, $p < .0001$; two-way ANOVA; Figure 8a).

Electron microscopy images of the spinal cord revealed axons surrounded by an extremely thin layer of myelin or a loose myelin sheath mostly in vehicle treated controls, suggesting a higher level of demyelinated axons than in the drug-treated mice (Figure 8b). Assessment of myelin sheath thickness by g-ratio evaluation (axon diameter/total outer diameter of the myelinated fiber) revealed that each treatment significantly reduced the mean g-ratio compared with the vehicle (Ctrl: 0.840 ± 0.005 ; testosterone: 0.783 ± 0.001 ; SAG: 0.767 ± 0.006 ; SAG+T: 0.765 ± 0.010 ; $p = .0001$). Linear regressions between g-ratio and axon diameter indicated that the differences between the slope of each treatment were extremely significant compared with the vehicle ($p < .0001$; Figure 8c–e). In addition, control animals displayed around half as many axons per field (61 ± 6) as testosterone (T) (93 ± 4), SAG (103 ± 4), or SAG+T (103 ± 5)-treated animals ($p < .0002$; Figure 8f). The percentage of abnormal fibers including myelin still compacted but detached from the axons, double myelin or multilayered myelin with obstructed axon was significantly higher in the untreated group (32 ± 2) compared to the groups receiving testosterone- (15 ± 2), SAG- (13 ± 2) or SAG+T- (8 ± 1 ; $p < .0001$; Figure 8g,h). Moreover, SAG+T-treated animals displayed a significantly lower level of abnormal fibers compared to animals receiving SAG ($p = .0231$) or T ($p = .0005$) alone. Altogether, the data indicated that both functional improvement and density of abnormal axons distinguished EAE animals treated with the drug combination.

We also investigated the cells contributing to local inflammation including reactive astrocytes and activated microglia known to be endowed with intricate pro- and anti-regenerative properties. We labeled spinal cord slices by using Iba1 and observed that the combined drugs induced a significant decrease in Iba1 staining (16 ± 2 vs. $36 \pm 3\%$ of Iba1 staining in the lesion area from SAG+T and control mice, respectively). Microglia displayed specifically in

this condition a morphology classically associated with nonactivated microglia, that is, a ramified morphology contrasting with the amoeboid shape of activated microglia (Figure 8). In contrast, amoeboid cells were mostly observed in vehicle- and testosterone-treated animals, whereas spinal cord derived from SAG-treated mice remarkably exhibited Iba1⁺ cells with one or the other morphology.

In agreement with results reported above in the LPC model, Arg-1 staining could be detected at a slightly higher level in the SAG condition ($11.5 \pm 1.3\%$ of Arg-1 staining in the lesion) compared with the control (6.6 ± 1.3 ; $p = .0257$). Moreover, as expected from the decrease in amoeboid microglia observed in SAG +T-treated animals, Arg-1⁺ staining was also decreased in these animals (1.9 ± 0.3 , $p < .0001$; Figure 8j,k). In contrast, astrogliosis

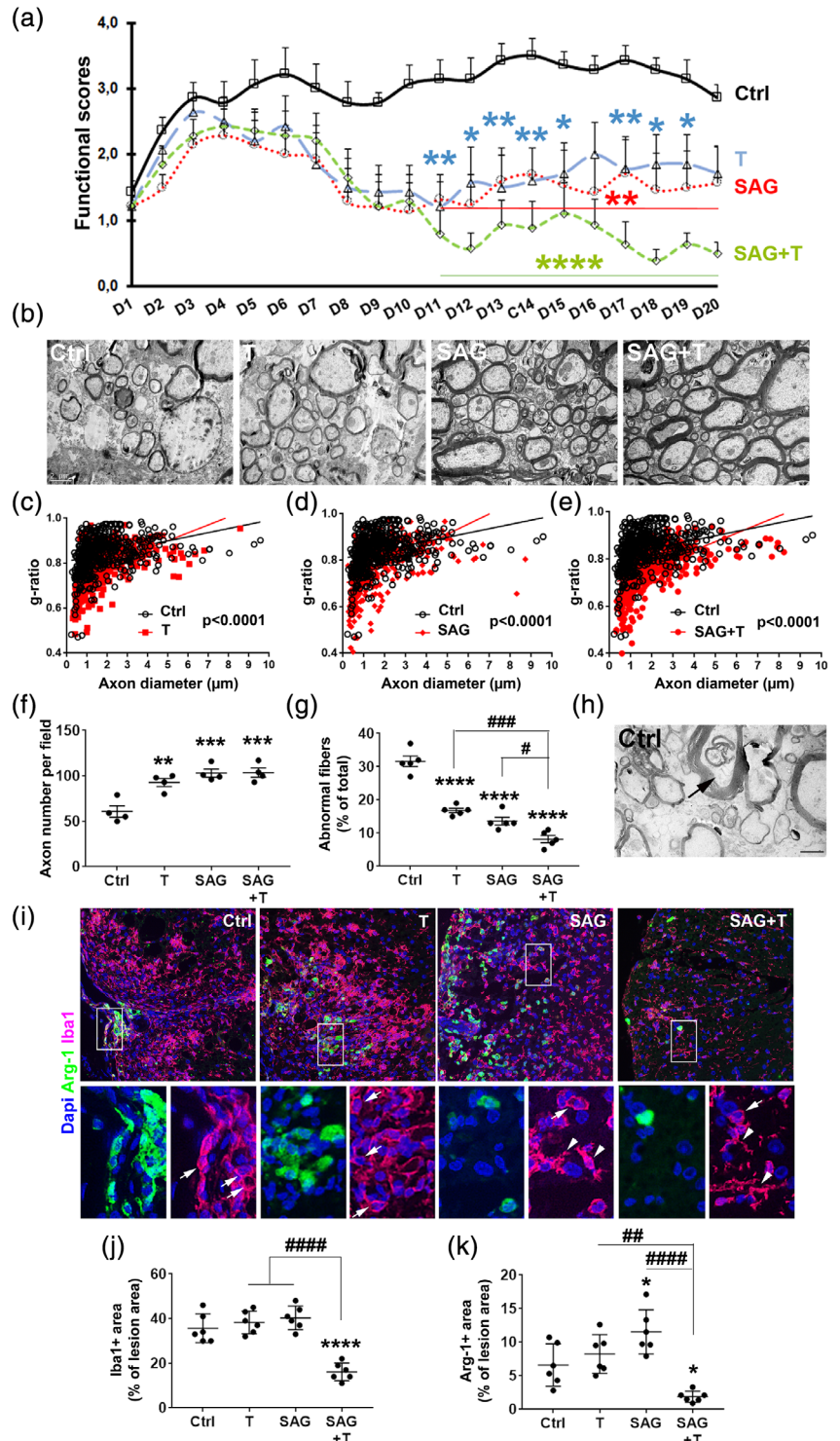


FIGURE 8 Combination therapy based on the simultaneous activation of the Hedgehog and androgen signaling pathways highly mitigates the course of chronic EAE disease. (a) EAE clinical scores evaluated after therapeutic administration of SAG and testosterone (T) used separately or simultaneously compared with vehicle (Ctrl) administration. (b) Electron micrographs of the thoracic spinal cord derived from the different groups. (c–e) Quantification of myelin sheath thickness in vehicle (Ctrl) and drug-treated animals by g-ratio (axon diameter/total outer diameter of the myelinated fiber) analysis at Day 30 after immunization. (f–h) Analysis of the total number of axons (f) and abnormal fibers (g) as shown in (h). (i–k) Immunostaining and quantification of Iba1⁺ Arg-1⁺ microglia/macrophages in spinal cord slices derived from EAE animals receiving the indicated treatment. The boxed area in (i) are magnified below. White arrows and arrowheads show amoeboid and ramified microglia, respectively. Ramified cells are detected in SAG and SAG+T conditions. Data are the mean \pm SEM from $n = 7$ animals per condition (A) or from the number of animals indicated in the plotted graphs. Then, 300–600 axons from $n = 3$ mice (c–e), 400–800 axons from $n = 4$ mice (f), 1,200 axons from $n = 5$ mice (g) were evaluated. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$; ****, $p < .0001$ versus the control condition. ##, $p < .01$; ####, $p < .0001$; #####, $p < .0001$ versus the indicated condition. Scale bars: 50 μm (i) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

determined by GFAP staining remained unmodified by the drug combination (Figure S7a,b). Moreover, the expression of claudin-5, one of the junctional proteins contributing to held together the specialized endothelial cells comprising the blood-brain barrier was

increased in a similar manner in all treated groups compared with the vehicle (Figure S7c,d).

Then, we investigated whether the cytokine profiles in the spleen and spinal cord were correlated with the high decrease in the density

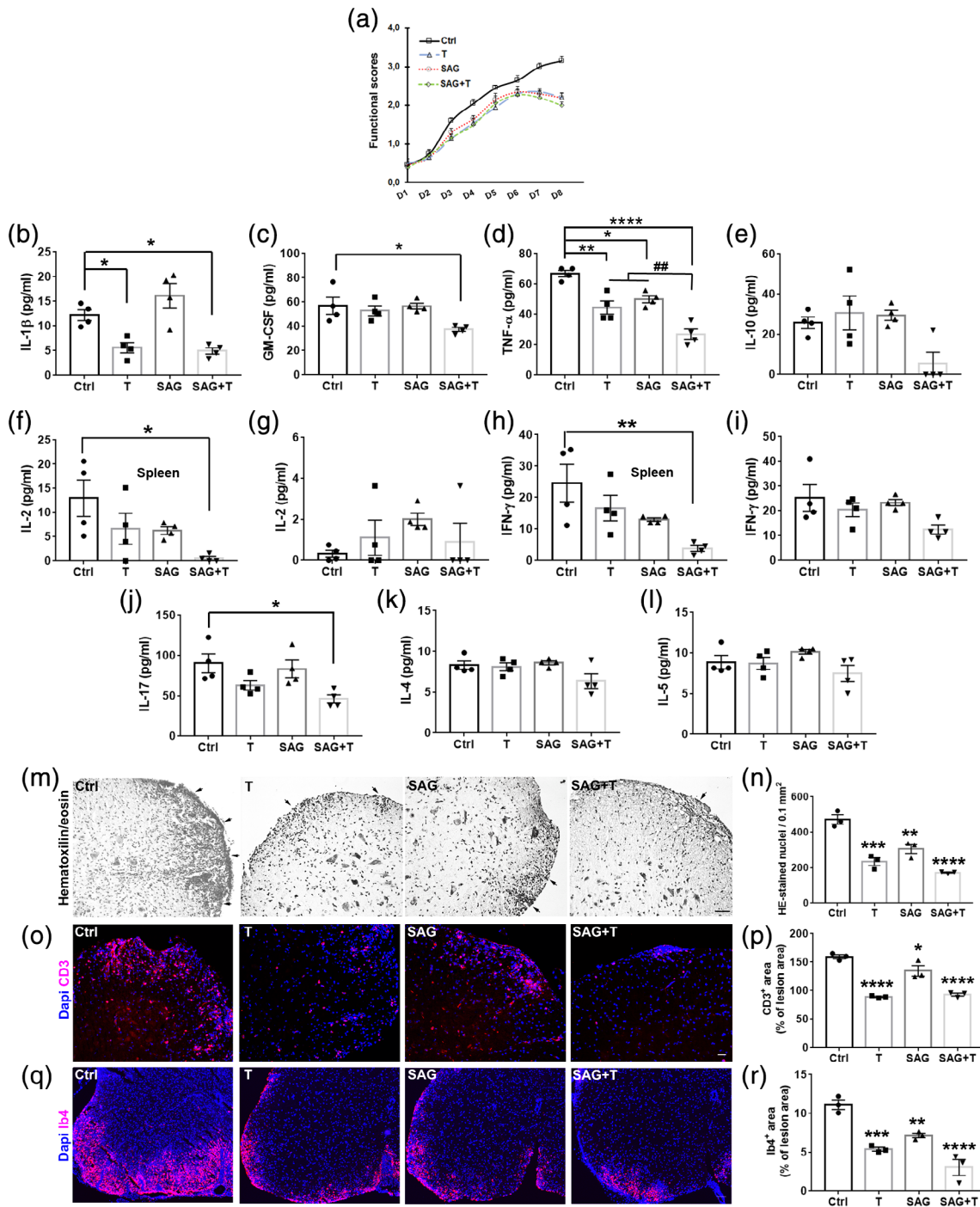


FIGURE 9 Cytokine secretion and immune cell infiltration in the EAE animals. (A) EAE clinical scores evaluated after therapeutic administration of SAG and testosterone (T) used separately or simultaneously compared with vehicle (Ctrl) administration. (b–l) Determination of cytokine levels in the spinal cord or spleen (as indicated) from EAE animals treated for 8 days from the onset of neurological disabilities. (m,n) Hematoxylin/eosin staining of the spinal cords and quantification. (o–r) Immunostaining and quantification of CD3⁺ lymphocytes and Ib4⁺ microglia/macrophages in spinal cord slices derived from the EAE animals. Data are the mean \pm SEM from the number of animals indicated in the plotted graphs. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$; ****, $p < .0001$ versus the control condition. #, $p < .01$ versus the indicated condition. Scale bars (μm): 50 (m), 100 (o), and 200 (q) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of activated microglia and in the number of abnormal fibers, both unique features of the animals receiving the drug combination. In this aim, we harvested tissues from animals treated with the drugs or vehicle for 8 days after onset of the neurological disabilities when the functional scores start to decline in the drug-compared to the vehicle-treated animals (Figure 9a). We determined the levels of pro-inflammatory (IL-1 β , IL-17A, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-4, IL-5, IL-10) cytokines and found a significant decrease in the pro-inflammatory molecules IL-1 β in testosterone (5.5 ± 0.7 ; $p = .02$) and SAG+T (4.9 ± 0.7 ; $p = .02$) animals compared to the controls (12.2 ± 1.2 ; Figure 9b), GM-CSF in SAG+T animals (37.4 ± 1.9 vs. 56.9 ± 8.1 ; $p = .04$; Figure 9c) and TNF- α in testosterone (44.5 ± 5.2 ; $p = .002$), SAG (50.0 ± 2.3 ; $p = .01$), and SAG+T (26.8 ± 3.2 ; $p < .0001$)-treated mice compared to the controls (66.8 ± 2.1 ; Figure 9d). Remarkably, the effect of the drug combination on the level of TNF- α was significantly higher than the effect induced by each drug used alone (Figure 9d). In agreement with the most important decrease of inflammation observed in the combined drug-treated animals, IL-10 secretion likely associated with the early innate immune response, was also decreased in this condition although without reaching significance (5.5 ± 5.5 vs. 25.7 ± 2.9 ; Figure 9e). IL-2 known to participate in the clonal expansion of T lymphocytes was significantly decreased in the spleen from SAG+T-treated animals (0.5 ± 0.3 vs. 12.9 ± 3.7 ; $p = .02$; Figure 9f) whereas it was detected at a very low level remaining unmodified in the spinal cord (0.9 ± 0.9 vs. 0.3 ± 0.1 ; Figure 9g). IFN- γ mainly associated with the pro-inflammatory subset of Th1 effector T helper cells was similarly and significantly decreased in the spleen (3.8 ± 0.9 vs. 24.6 ± 5.9 ; $p = .01$; Figure 9h) from the same animals. The decrease could also be observed in the spinal cord although it did not reach significance (12.4 ± 2.2 vs. 25.2 ± 5.4 ; Figure 9i). Finally, a significant decrease of IL-17A known to be associated with the Th17 effector T cell subset (46.2 ± 5.3 vs. 90.3 ± 12.8 ; $p = .02$; Figure 9j) was also specifically detected in the spinal cord from animals receiving SAG+T. In contrast, the levels of the Th2 anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-5 remained unmodified whatever the condition (Figure 9k,l). Due to the deleterious effect of GM-CSF previously reported in the EAE model (Komuczki et al., 2019), we determined whether the transcription of *Csf2*, the gene encoding GM-CSF, was also regulated. We found a significant downregulation of *Csf2* transcription in animals receiving SAG+T (0.09 ± 0.03 vs. 0.97 ± 0.17 ; $p = .004$; Figure S8). Moreover, visualization of immune cell infiltration into the spinal cord was performed via hematoxylin/eosin staining (Figure 9m,n), as well as CD3 (Figure 9o,p) and Ib4 (Figure 9q,r) immunostainings, which allow the detection of T lymphocytes and microglia/macrophages, respectively. A lower cell infiltration was observed in all drug-treated animals. SAG+T condition displayed the lowest density of infiltrated cells with values significantly different from those obtained for SAG-, but not for testosterone-treated mice.

Finally, we explored immune cell subsets present in the CNS-draining lymph nodes known to be essential for the balancing of protective or tolerogenic versus detrimental responses in the CNS (van Zwam et al., 2009). The phenotype and activation status of lymph

node cells were assessed by flow cytometry and cells were gated as shown in Figure S9. In the myeloid lineage, although the proportion of macrophages tended to increase in animals receiving the combined drugs, the value did not reach significance (Figure 10a). Granulocytes remained unmodified (Figure 10b). In contrast, a significantly higher proportion of dendritic cells was detected in testosterone (15.2 ± 1.2 ; $p = .04$) and SAG+T (14.5 ± 0.8 ; $p = .04$) condition compared to the controls (6.0 ± 0.4 ; Figure 10c). In the lymphoid lineage, testosterone (20.7 ± 1.2 , $p \leq .0001$) and the combined drugs (22.7 ± 2.1 , $p \leq .0001$) significantly decreased the percentage of CD90⁺ T cells compared to the controls (39.0 ± 2.3 ; Figure 10d). Although to a lesser extent, SAG also decreased this cell population (33.5 ± 0.6 , $p = .04$). The proportion of the CD4⁺ T cell subpopulation was decreased by testosterone (51.2 ± 1.2 ; $p = .01$) or SAG+T (50.6 ± 1.1 ; $p = .007$) compared to the vehicle (57.6 ± 0.3 ; Figure 10e). In the same line, the proportion of the CD44^{lo}CD45RB^{hi} naive CD4⁺ T cell subset was also significantly lower in testosterone- (44.7 ± 4.3 ; $p = .0002$) and SAG+T- (45.9 ± 2.3 ; $p = .0003$) compared to vehicle- (67.6 ± 1.2 ; Figure 10f) treated animals. The proportion of the CD44^{hi}CD45RB^{lo} effector/memory CD4⁺ T cell subset was conversely increased by testosterone (49.8 ± 3.8 ; $p = .001$) and the combined drugs (45.5 ± 3.0 ; $p = .005$) compared to the controls (30.5 ± 1.1 ; Figure 10g). Finally, the effector Th cell subsets expressing either T-bet (Th1; Figure 10h) or ROR- γ t (Th17; Figure 10i) transcription factors were not significantly modified by the drugs whereas the population of Foxp3-expressing CD44^{hi}CD45RB^{lo} regulatory CD4⁺ T cells was significantly increased by both testosterone (37.0 ± 1.1 ; $p \leq .0001$), SAG (25.7 ± 0.3 ; $p = .02$), and SAG+T (31.2 ± 1.4 ; $p = .0002$) treatment compared to the controls (21.7 ± 0.7 ; Figure 10j). Altogether, these data indicated that the combined drugs induce in a synergistic manner the decrease of the pro-inflammatory cytokines GM-CSF, TNF- α , IL-17A in the spinal cord as well as the decrease of IL-2 and IFN- γ in the spleen. In addition, testosterone is the main regulator of peripheral immune cells in the absence or presence of SAG whereas SAG displays only moderate effects on peripheral immunity.

4 | DISCUSSION

The questions addressed in the present work were whether the Hedgehog and androgen signaling pathways may act in concert during developmental myelination and in the context of myelin regeneration when developmental processes are partially recapitulated (Fancy, Chan, Baranzini, Franklin, & Rowitch, 2011). We found that these signaling cascades need to be temporally coordinated to give rise to proper myelination of the dorsal forebrain. Moreover, we uncovered an unexpected convergence of their activities toward an accelerated regeneration of myelin that might involve their respective effects on microglia and astrocyte response to CNS demyelination, but also toward a lower level of critical proinflammatory cytokines known to be associated with EAE pathogenicity. The data also show the potent activity of testosterone in the presence or absence of SAG on peripheral immune cells contributing to increase the tolerogenic CD11c⁺

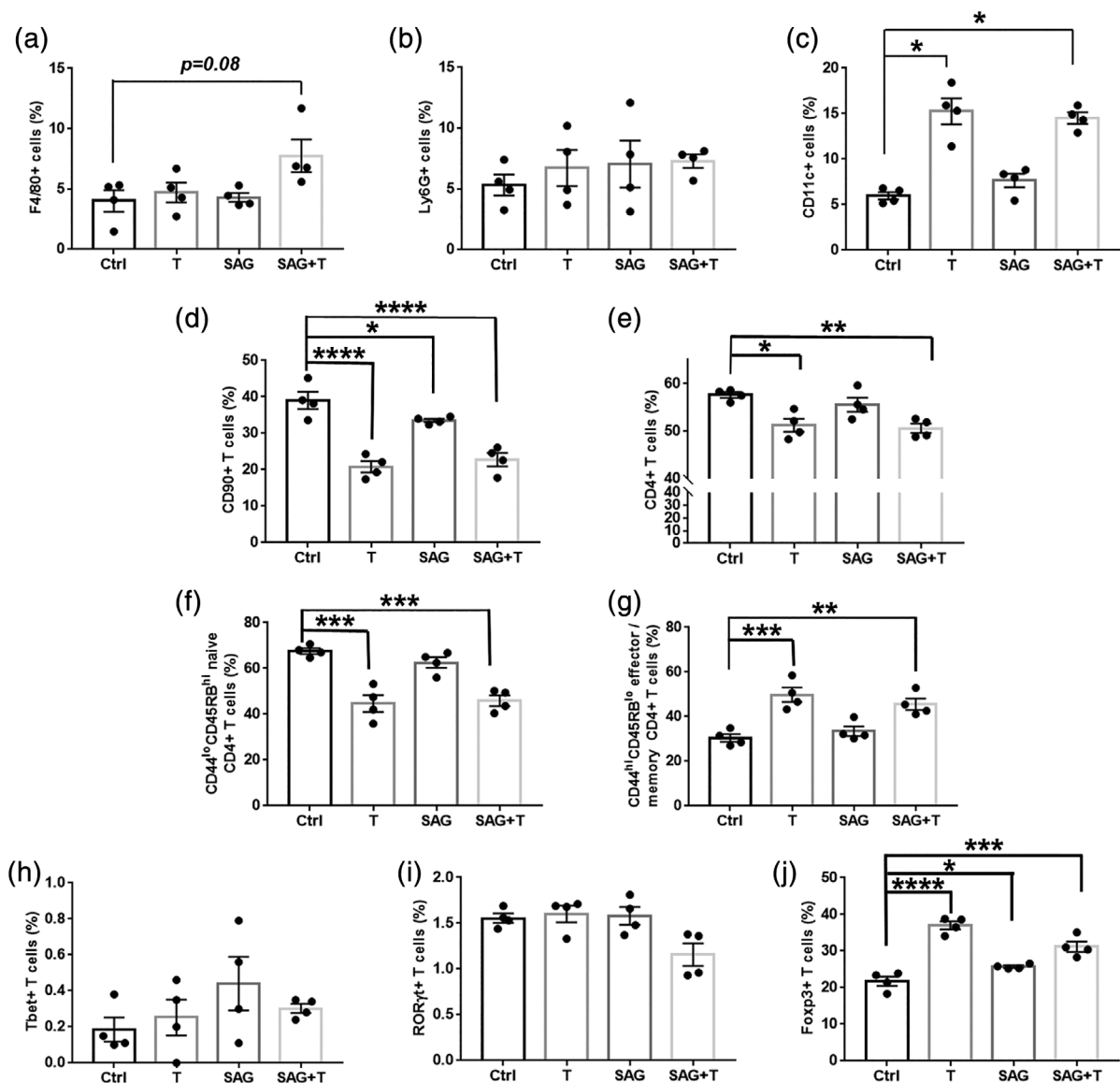


FIGURE 10 Immunophenotyping of myeloid and lymphoid cells from the draining lymph nodes. Flow cytometry analyses were performed on cells isolated from inguinal lymph nodes derived from EAE animals treated for 8 days with the indicated drugs from onset of neurological disabilities onward. The indicated myeloid (a–c) and lymphoid (d–j) cells were analyzed according to the gating strategies described in Figure S9. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$; ****, $p < .0001$ versus the control condition

dendritic cells, to reduce the clonal expansion of conventional CD4⁺ T cells and to increase CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, which are indispensable for the maintenance of immunological self-tolerance.

During development, our data indicate that the Hedgehog and androgen pathways are both present and active at the earliest steps of cortical oligodendrogenesis. Although Smo expression has been previously reported in neonatal NSCs (Tong et al., 2015; Winkler et al., 2018), we here provide the first evidence for AR expression in this cell type. Indeed, previous works had only reported a sparse expression of AR in the neonatal mouse brain (Juntti et al., 2010; McAbee & DonCarlos, 1998) and detected the receptor in embryonic NSCs (Tosetti et al., 2017). At this early step of postnatal development, SVZ-derived NSCs expand substantially. Cells specified to a

neuronal lineage migrate rostrally to the olfactory bulbs while those specified to become oligodendrocytes or astrocytes emerge radially from the SVZ toward the developing subcortical white matter (C. A. Marshall et al., 2005). By tracing the whole population of NSCs and their progeny, we found that the genetic removal of AR or Smo from Glast-expressing NSCs leads to distinct phenotypes. Indeed, the conditional removal of AR did not modify the total number of NSCs and glial progeny, but induced an imbalance in the proportion of astroglial and oligodendroglial cells supporting a yet unsuspected role for AR in the control of NSC commitment toward the oligodendroglial fate at the expense of the astroglial one. This result documents a novel and nonreproductive function of AR in the early postnatal CNS besides its transcriptional role previously proposed in the expression

of the long noncoding RNA Sox2 overlapping transcript that is essential in the control of gene expression during embryonic neurogenesis (Tosetti et al., 2017). This novel role of AR is consistent with the increase in brain levels of testosterone during the neonatal period that remains elevated during the first 10 postnatal days (Abi Ghanem et al., 2017). On the other side, the conditional removal of Smo resulted in a clear drop in the total number of NSCs and their glial progeny without any imbalance in the generation of astroglial and oligodendroglial cells. These data are consistent with previous works showing first that Smo conditional removal from nestin-expressing NSCs at E12.5 results in SVZ cell programmed cell death during the early postnatal period (Balordi & Fishell, 2007; Machold et al., 2003) and second that Smo-mediated signal is required for late embryonic and early postnatal OPC production from Emx1⁺ dorsal progenitors (Kessar et al., 2006; Tong et al., 2015; Winkler et al., 2018). Our data now provide evidence that Smo-mediated signal is not implicated in the determination of the astroglial or oligodendroglial fate of NSCs, a question that had not been previously addressed. As a whole, we show that Smo and AR-mediated signals via the control of the production/maintenance and fate determination of NSCs, respectively, act at successive and complementary steps during the earliest stage leading to oligodendrogenesis.

In order to delineate the role of each signaling pathway at the steps of oligodendrogenesis occurring later than the massive production of NSCs, we used pharmacological tools (SAG, SANT, and testosterone) to supplement glial cell cultures devoid of NSCs or treat mouse pups starting at P5, that means after the emergence of the bulk of SVZ-derived OPCs that occurs around birth. We have previously reported that AR-mediated effect of testosterone accounts for the sex difference detected in myelin thickness that is higher in male compared to female pups (Abi Ghanem et al., 2017). Now, we provide evidence that testosterone is endowed with a yet unsuspected and strong ability to promote myelination in the early male postnatal dorsal forebrain and that this effect does not require the aromatase-dependent conversion of testosterone. In a consistent manner, AR transcription is strongly up-regulated from P8 onward and strictly correlated with the up-regulation of the main myelin protein, MBP. Regarding Hedgehog signaling, although previous genetic approaches were mainly aimed at tracing the populations of neural progenitors giving rise to the dorsal wave of oligodendrogenesis (Tong et al., 2015; Winkler et al., 2018), our data allow now to characterize Smo-mediated signal as a potent promoter of OPC proliferation and consequently as an inhibitor of OPC differentiation and myelination. This observation is in agreement with the blockade of the pro-myelinating activity of testosterone by the Smo agonist SAG. It also suggests that Hedgehog signaling activity should be strictly controlled throughout the process of developmental myelination. Thus, Smo-mediated Hedgehog signal should be ON for SVZ-derived NSC maintenance and for substantial proliferation of NSC-derived OPCs occurring during the first early postnatal days. This result is consistent with the high decrease of the number of Olig2-expressing cells previously reported in the brain from animals displaying conditional removal of Smo in Gli1-expressing NSCs at P0 (Tong et al., 2015).

Later on, Smo-mediated signal should progressively decrease until becoming OFF for leading to the synthesis of the first myelin fibers in agreement with the earlier myelination previously reported in the mutant mice null for Gli1 activity (Samanta et al., 2015). This temporal profile of Smo activity is consistent with the transcriptional profile that we have established for the readout of Hedgehog signaling, Gli1, whose transcription significantly decreases from P8 onward in the dorsal forebrain, the time at which AR and MBP transcription are both up-regulated when the first myelin fibers occur.

Altogether our data lead to propose a model according which at perinatal time, Smo-mediated Hedgehog signal is involved in the maintenance of NSCs whose fate determination is promoted toward the oligodendroglial lineage via AR-mediated signaling. OPC proliferation is then increased in a Smo-dependent manner. During the first postnatal week, the main transcriptional effector of the Hedgehog signaling, Gli-1, is down-regulated while AR is concomitantly up-regulated allowing testosterone to induce its pro-myelinating activity consistent with the observed increase in MBP transcription. Our work does not support the hypothesis that the tight coordination between the Hedgehog and androgen activities during developmental myelination is related to any molecular interaction since we detected no cross-transcriptional regulation among the genes that have been assessed. We cannot exclude that the pharmacological modulation of Hedgehog signaling might disturb many other OPC/myelination regulatory pathways such as Wnt, BMP, FGF, Notch, or TGF β known to be involved in early oligodendrogenesis (Azim et al., 2016). Whatever the mechanism of these concerted activities, the need for down-regulating Hedgehog signaling for proper developmental myelination is consistent with the thin corpus callosum observed in patients presenting with a Gorlin syndrome where inactivating mutations in the Hedgehog receptor Ptc prevent the repression of Smo activity, thus maintaining a high activation of Hedgehog signaling (Kantarci et al., 2003).

Beyond the temporal coordination required between the Hedgehog and androgen pathways for proper developmental myelination, our data also provide evidence for their unexpected functional cooperation in the context of CNS demyelination. In agreement with their developmental activity, SAG induces OPC proliferation while testosterone promotes OPC differentiation into myelinating cells under demyelinating conditions. However, each molecule displays an additional activity conferring to each of them a dual role contributing to both OPC proliferation and differentiation. Most importantly, the co-activation of these pathways results in a substantial acceleration of both OPC differentiation and myelin regeneration in the LPC model of demyelination. Under repairing conditions, local inflammatory cells including astrocytes and microglia, are endowed with beneficial or deleterious effects, which respectively promote or impair the endogenous capacity of OPCs to induce spontaneous remyelination after myelin loss (R. J. M. Franklin & French-Constant, 2017; Traiffort, Kassoussi, Zahaf, & Laouarem, 2020). These cells thus constitute additional targets for the small molecules assessed for their remyelinating properties. Our data reveal that SAG precociously increases the anti-inflammatory marker Arg-1 in Iba1⁺ microglia. In a consistent manner,



the conditional removal of Smo from microglia results in a strong decrease in Arg-1 expression in this cell type. Since the subset of microglia, which express anti-inflammatory markers such as Arg-1, has been previously proposed to drive OPC differentiation during CNS remyelination (Miron et al., 2013), our results suggest that Smo is cell-autonomously required for the response of microglia to a demyelinating event and that the pro-differentiating activity of SAG is related to its effect on microglia. In agreement with this hypothesis, the conditional Smo mutant mice display a lower ability to differentiate OPCs into oligodendrocytes. Therefore, we propose that during remyelination, Smo-mediated signal may promote both OPC proliferation and differentiation by acting on OPCs and microglia, respectively. Although SAG did not regulate GFAP expression in agreement with the restricted up-regulation of Smo in astrocytes in the LPC model (Ferent et al., 2013), we cannot exclude effects on specific astrocyte subsets that would deserve to be further investigated. On the contrary, testosterone (without requiring its aromatase-mediated conversion into estrogens) increased GFAP expression in the demyelinated corpus callosum as expected from our previous results in the spinal cord (Bielecki et al., 2016), but the hormone did not regulate Iba1⁺ microglia. Whether the higher remyelinating activity induced by the combined drugs compared to each drug used alone, is related to the convergence of beneficial activities mediated by SAG on microglia and by testosterone on astrocytes, remains a hypothesis that would deserve to be assessed.

The therapeutic administration of the drugs used alone or in combination in the EAE model leads to the regression of neurological disabilities not observed in the control animals. However, the quite complete functional recovery occurs only in the animals receiving the combined drugs, which is consistent with the significantly lower number of abnormal fibers detected in these animals. The lower g-ratio values observed in all drug-treated animals reflects thicker myelin and thus protective- and/or regenerative effects, which are both critical for preventing the deleterious consequences of CNS demyelination (R. J. Franklin & Goldman, 2015; R. J. M. Franklin & ffrench-Constant, 2017). In the same line, the lower infiltration of immune cells and the higher expression of the junction protein Claudin-5 observed in all drug-treated animals suggest that the neuroinflammatory process is likely initiated at a much lower level in these animals. In this regard, blood-brain barrier dysfunction previously reported upon chronic depletion of gonadal testosterone (Atallah, Mhaouty-Kodja, & Grange-Messent, 2017) and blood-brain barrier integrity promoted by astrocyte-derived Hedgehog proteins (Alvarez et al., 2011) are consistent with this hypothesis. However, all these effects cannot account for the unique functional improvement and lower number of abnormal fibers induced by the combined drugs unlike the effects of the latter on the spinal cord cytokines. Indeed, the combined drugs synergistically decrease the pro-inflammatory cytokines GM-CSF, TNF- α and IL-17A. The decrease of GM-CSF and TNF- α may reflect a lower infiltration of the pro-inflammatory phagocytes that are known to secrete high levels of such deleterious molecules (Mishra & Yong, 2016). Moreover, the lower inflammation level that characterizes the combined drug-treated animals, is consistent with the decrease of the anti-inflammatory

cytokine IL-10, which may reflect the least severity of the disease in these animals (Matsushita, Horikawa, Iwata, & Tedder, 2010). Indeed, IL-10, which can be produced by a variety of immune cells such as M2-type macrophages, dendritic cells, regulatory CD4⁺ T cells, Th2 cells and regulatory B cells, is recognized to interfere with the intensity and duration of immune responses. However, an increase in IL-10 could have been expected if we consider our data suggesting that SAG is able to up-regulate anti-inflammatory markers (including IL-10) in microglia. Since microglia activation that is involved both in shaping the molecular environment and phagocytosis of debris, occurs quite lately (between 14 and 17 dpi) in the EAE model (Caravagna et al., 2018), the increase of anti-inflammatory markers in this cell type is likely yet too low to be detected at the time point (15 dpi) when we analyzed the cytokine levels.

Besides these anti-inflammatory effects, the synergistic activities of SAG and testosterone also result in the drop of IL-2 secretion in the spleen, which also undoubtedly participates in the functional cooperation between the Hedgehog and androgen modulators. Indeed, IL-2 is namely produced by T lymphocytes and required for antigen-driven clonal expansion of T cells (Bachmann & Oxenius, 2007). We may thus confidently assume that one of the first activities of the combined drugs is to highly restrict T cell proliferation in agreement with the high decrease of CD90⁺ T cells observed in the lymph nodes. However, SAG and testosterone did not act synergistically to reduce the proportion of T cells in the lymphoid organs and thus this effect cannot account for the synergistic activity of the drugs on IL-2 production. However, since IL-2 is also produced by dendritic cells and since dendritic cell-mediated IL-2 production depends on GM-CSF level itself synergistically regulated by the combined drugs (Zelante, Fric, Wong, & Ricciardi-Castagnoli, 2012), we may suggest the potential existence of a regulatory loop involving the dendritic cells and resulting in the synergistic control of both GM-CSF- and IL-2 production.

The decrease of T cells induced by testosterone alone or combined with SAG is likely related to the decrease of the CD4⁺ T cell subset, in agreement with the role of testosterone previously reported in the negative selection of self-reactive CD4⁺ T cells involved in androgen-dependent protection against auto-immunity (M. L. Zhu et al., 2016). Moreover, the shift of naïve- toward effector/memory-CD4⁺ T cells as well as the promotion of the Foxp3⁺ T regulator phenotype observed under testosterone and SAG+T conditions are also likely important for the lower inflammatory status since the T regulator phenotype is known to prevent autoimmunity by controlling immune response to self and foreign antigens (Matsushita et al., 2010). Although the combined drugs did not seem to act on the proportion of the T-bet⁺ (Th1) and ROR- γ ⁺ (Th17) cell subsets both known to be involved in the pathogenesis of EAE (Loos et al., 2020), we detected a synergistic activity leading the combined drugs to decrease the levels of the cytokines IFN- γ (in the spleen) and IL-17A (in the spinal cord) mainly produced by Th1 and Th17 cells, respectively. This unexpected absence of correlation between the T-cell subset numbers and the cytokine profile might reflect the activity of the combined drugs on the plasticity of these cells as mostly reported for Th17 cells (Renaude et al., 2020).

Remarkably, phagocytes and T cells are known to be included in a vicious circle where the pro-inflammatory phagocytes promote the activation of T cells while conversely T cells induce myeloid cells to become pro-inflammatory. The interaction between those cells was proposed to be mediated by the cytokine GM-CSF, which is a requisite for the development of EAE (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011). GM-CSF produced by encephalitogenic T cells causes the expression of chemokines by a subpopulation of monocytes and the production of active IL-1 β through activation of inflammasomes in the same cells, leading to sustained inflammation and CNS tissue injury (Croxford et al., 2015). Therefore, the significant decrease of GM-CSF levels induced by the combined drugs suggests that SAG and testosterone may cooperate at this level in order to break the vicious circle leading to sustained neuroinflammation. Furthermore, the IL-1 β decrease induced by the drug combination is also consistent with the decrease of GM-CSF since IL-1 β has been previously reported to be one of the cytokines that are indispensable for the production of GM-CSF and thus pathogenic T cell generation in the EAE model (El-Behi et al., 2011; Komuczki et al., 2019). Finally, the higher proportion of dendritic cells present in the draining lymph nodes from testosterone and SAG+T-treated animals is consistent with the activation of these cells in the spinal cord and their subsequent migration toward the lymph nodes. Given the decrease in the pro-inflammatory cytokines and in the proportion of CD90⁺ T cells, but also the increase in the proportion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, we may confidently propose that the dendritic cells accumulated in the lymph nodes likely display a critical tolerogenic phenotype in SAG+T-treated animals.

As a whole, our work provides evidence for coordinated and cooperative activities between the Hedgehog and androgen pathways during developmental and regenerative myelination, respectively. Besides providing an original insight into the molecular control of developmental myelination whose functional integrity is known to contribute to cognitive and behavioral capacities (Fields, 2015; McGee, Yang, Fischer, Daw, & Strittmatter, 2005), this work may have important therapeutic fallout namely due to the unique multitarget activity profile displayed by the co-activation of these pathways. The improvement of myelin regeneration and lowering of neuroinflammation are likely important to consider in the context of secondary progressive multiple sclerosis (Fitzner & Simons, 2010; R. J. M. Franklin & French-Constant, 2017; Lubetzki, Sol-Foulon, & Desmazieres, 2020). Of note, males display a higher risk of secondary progressive multiple sclerosis than females (Ribbons et al., 2015) and low testosterone levels have been correlated with disease severity (Bove et al., 2014). Data derived from the present work appear important to consider in potential therapeutic perspectives that might break the vicious circle inflammation-demyelination-neurodegeneration that up to now cannot be halted by currently available treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. P. Durbec and M. Cayre for scientific discussions regarding a preliminary version of this work, O. Trassard and A. Schmitt for technical assistance in imaging and transmission

electron microscopy, respectively. This work was also supported by the French Multiple Sclerosis Foundation ARSEP [RAK17128LLA and RAK19176LLA to E.T.]. Yousra Laouarem was funded by Mattern Foundation. Abdelmoumen Kassoussi was funded by grants from the French Government and ARSEP.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare competing financial interests. A patent application exists. The Applicant is MetP Pharma AG. The inventors are Claudia Mattern, Elisabeth Traiffort and Michael Schumacher. The application number is PCT/IB2019/050198 and the status is "granted." The specific aspect of the manuscript covered in the patent application is the use of the drug combination in demyelinating and inflammatory diseases as well as the design of specific pharmaceutical formulations allowing the delivery of the combination therapy notably through the intranasal route.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Yousra Laouarem, Abdelmoumen Kassoussi, and Elisabeth Traiffort designed the experiments. Yousra Laouarem, Abdelmoumen Kassoussi, Amina Zahaf, Tom Hutteau-Hamel, and Amine Mellouk performed the experiments; Yousra Laouarem, Abdelmoumen Kassoussi, Pierre Bobé, Claudia Mattern, Michael Schumacher, and Elisabeth Traiffort analyzed data. Elisabeth Traiffort wrote the paper.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Elisabeth Traiffort  <https://orcid.org/0000-0002-9645-6269>

REFERENCES

- Abi Ghanem, C., Degerny, C., Hussain, R., Liere, P., Pianos, A., Tourpin, S., ... Ghomari, A. M. (2017). Long-lasting masculinizing effects of post-natal androgens on myelin governed by the brain androgen receptor. *PLoS Genetics*, 13(11), e1007049. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007049>
- Alvarez, J. I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P. J., Terouz, S., ... Prat, A. (2011). The hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*, 334(6063), 1727–1731. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>
- Arevalo, M. A., Ruiz-Palmero, I., Scerbo, M. J., Acaz-Fonseca, E., Cambiasso, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Molecular mechanisms involved in the regulation of neuritogenesis by estradiol: Recent advances. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 131(1–2), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.09.004>
- Atallah, A., Mhaouty-Kodja, S., & Grange-Messent, V. (2017). Chronic depletion of gonadal testosterone leads to blood-brain barrier dysfunction and inflammation in male mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(9), 3161–3175. <https://doi.org/10.1177/0271678X16683961>
- Azim, K., Berninger, B., & Raineteau, O. (2016). Mosaic subventricular origins of forebrain oligodendrogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 107. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00107>



- Bachmann, M. F., & Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: From immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Reports*, 8(12), 1142–1148. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401099>
- Balordi, F., & Fishell, G. (2007). Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27(22), 5936–5947.
- Banks, W. A., Morley, J. E., Niehoff, M. L., & Mattern, C. (2009). Delivery of testosterone to the brain by intranasal administration: Comparison to intravenous testosterone. *Journal of Drug Targeting*, 17(2), 91–97. <https://doi.org/10.1080/10611860802382777>
- Bielecki, B., Mattern, C., Ghomari, A. M., Javaid, S., Smietanka, K., Abi Ghanem, C., ... Traiffort, E. (2016). Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(51), 14829–14834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614826113>
- Bove, R., Musallam, A., Healy, B. C., Raghavan, K., Glanz, B. I., Bakshi, R., ... Chitnis, T. (2014). Low testosterone is associated with disability in men with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 20(12), 1584–1592. <https://doi.org/10.1177/1352458514527864>
- Briscoe, J., & Small, S. (2015). Morphogen rules: Design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development*, 142(23), 3996–4009. <https://doi.org/10.1242/dev.129452>
- Caravagna, C., Jaouen, A., Desplat-Jego, S., Fenrich, K. K., Bergot, E., Luche, H., ... Debarbieux, F. (2018). Diversity of innate immune cell subsets across spatial and temporal scales in an EAE mouse model. *Scientific Reports*, 8(1), 5146. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22872-y>
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., & Beachy, P. A. (2002). Small molecule modulation of smoothed activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14071–14076.
- Codarra, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., ... Becher, B. (2011). RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*, 12(6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/ni.2027>
- Croxford, A. L., Lanzinger, M., Hartmann, F. J., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., ... Becher, B. (2015). The cytokine GM-CSF drives the inflammatory signature of CCR2+ monocytes and licenses autoimmunity. *Immunity*, 43(3), 502–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.010>
- Durston, A. J. (2019). What are the roles of retinoids, other morphogens, and Hox genes in setting up the vertebrate body axis? *Genesis*, 57(7–8), e23296. <https://doi.org/10.1002/dvg.23296>
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., ... Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature Immunology*, 12(6), 568–575. <https://doi.org/10.1038/ni.2031>
- Fancy, S. P., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J., & Rowitch, D. H. (2011). Myelin regeneration: A recapitulation of development? *Annual Review of Neuroscience*, 34, 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113629>
- Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M., & Traiffort, E. (2013). Sonic hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *The Journal of Neuroscience*, 33(5), 1759–1772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013>
- Feutz, A. C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Mieke, M., & Ghandour, M. S. (2001). An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: Defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia*, 34(4), 241–252.
- Fields, R. D. (2015). A new mechanism of nervous system plasticity: Activity-dependent myelination. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(12), 756–767. <https://doi.org/10.1038/nrn4023>
- Fitzner, D., & Simons, M. (2010). Chronic progressive multiple sclerosis—Pathogenesis of neurodegeneration and therapeutic strategies. *Current Neuropharmacology*, 8(3), 305–315. <https://doi.org/10.2174/157015910792246218>
- Franklin, R. J., & Goldman, S. A. (2015). Glia disease and repair—Remyelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a020594. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020594>
- Franklin, R. J. M., & ffrench-Constant, C. (2017). Regenerating CNS myelin—From mechanisms to experimental medicines. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(12), 753–769. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.136>
- Hussain, R., Ghomari, A. M., Bielecki, B., Steibel, J., Boehm, N., Liere, P., ... Ghandour, M. S. (2013). The neural androgen receptor: A therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain*, 136(1), 132–146. <https://doi.org/10.1093/brain/aws284>
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes & Development*, 15(23), 3059–3087.
- Juntti, S. A., Tollkuhn, J., Wu, M. V., Fraser, E. J., Soderborg, T., Tan, S., ... Shah, N. M. (2010). The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron*, 66(2), 260–272. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.024>
- Kantarci, M., Ertas, U., Alper, F., Sutbeyaz, Y., Karasen, R. M., & Onbas, O. (2003). Gorlin's syndrome with a thin corpus callosum and a third ventricular cyst. *Neuroradiology*, 45(6), 390–392. <https://doi.org/10.1007/s00234-003-0988-y>
- Karim, H., Kim, S. H., Lauderdale, K., Lapato, A. S., Atkinson, K., Yasui, N., ... Tiwari-Woodruff, S. K. (2019). Analogues of ERbeta ligand chloroindazole exert immunomodulatory and remyelinating effects in a mouse model of multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 9(1), 503. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37420-x>
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>
- Komuczki, J., Tuzlak, S., Friebe, E., Hartwig, T., Spath, S., Rosenstiel, P., ... Becher, B. (2019). Fate-mapping of GM-CSF expression identifies a discrete subset of inflammation-driving T helper cells regulated by cytokines IL-23 and IL-1beta. *Immunity*, 50(5), 1289–1304. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.006>
- Kong, J. H., Siebold, C., & Rohatgi, R. (2019). Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development*, 146(10), dev166892. <https://doi.org/10.1242/dev.166892>
- Kopinke, D., Norris, A. M., & Mukhopadhyay, S. (2020). Developmental and regenerative paradigms of cilia regulated hedgehog signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1084–9521(19), 30163–30166. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.029>
- Laouarem, Y., & Traiffort, E. (2018). Developmental and repairing production of myelin: The role of hedgehog signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 305. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00305>
- Levison, S. W., & Goldman, J. E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*, 10(2), 201–212. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90311-e](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90311-e)
- Lloyd, A. F., & Miron, V. E. (2019). The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nature Reviews. Neurology*, 15, 447–458. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0184-2>
- Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y., & McMahon, A. P. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*, 128(24), 5099–5108.
- Loos, J., Schmaul, S., Noll, T. M., Paterka, M., Schillner, M., Loffel, J. T., ... Bittner, S. (2020). Functional characteristics of Th1, Th17, and ex-Th17 cells in EAE revealed by intravital two-photon microscopy.

- Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 357. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02021-x>
- Lubetzki, C., Sol-Foulon, N., & Desmazieres, A. (2020). Nodes of Ranvier during development and repair in the CNS. *Nature Reviews. Neurology*, 16, 426–439. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0375-x>
- Luskin, M. B., & McDermott, K. (1994). Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone. *Glia*, 11(3), 211–226. <https://doi.org/10.1002/glia.440110302>
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., ... Fishell, G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*, 39(6), 937–950.
- Mallon, B. S., Shick, H. E., Kidd, G. J., & Macklin, W. B. (2002). Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 876–885.
- Marshall, G. P., 2nd, Ross, H. H., Suslov, O., Zheng, T., Steindler, D. A., & Laywell, E. D. (2008). Production of neurospheres from CNS tissue. *Methods in Molecular Biology*, 438, 135–150. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-133-8_12
- Marshall, C. A., Novitsch, B. G., & Goldman, J. E. (2005). Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *The Journal of Neuroscience*, 25(32), 7289–7298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1924-05.2005>
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., & Tedder, T. F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *Journal of Immunology*, 185(4), 2240–2252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001307>
- Matus, D. Q., Magie, C. R., Pang, K., Martindale, M. Q., & Thomsen, G. H. (2008). The hedgehog gene family of the cnidarian, *Nematostella vectensis*, and implications for understanding metazoan hedgehog pathway evolution. *Developmental Biology*, 313(2), 501–518. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.032>
- McAbee, M. D., & DonCarlos, L. L. (1998). Ontogeny of region-specific sex differences in androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat forebrain. *Endocrinology*, 139(4), 1738–1745. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5940>
- McGee, A. W., Yang, Y., Fischer, Q. S., Daw, N. W., & Strittmatter, S. M. (2005). Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science*, 309(5744), 2222–2226. <https://doi.org/10.1126/science.1114362>
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., & Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *The Journal of Neuroscience*, 26(30), 7907–7918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006>
- Miron, V. E., Boyd, A., Zhao, J. W., Yuen, T. J., Ruckh, J. M., Shadrach, J. L., ... Charles Ffrench-Constant. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, 16(9), 1211–1218. <https://doi.org/10.1038/nn.3469>
- Mishra, M. K., & Yong, V. W. (2016). Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 12(9), 539–551. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.110>
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kuhn, R., & Gotz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—A valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*, 54(1), 21–34.
- Naruse, M., Ishino, Y., Kumar, A., Ono, K., Takebayashi, H., Yamaguchi, M., ... Hitoshi, S. (2016). The Dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. *Cerebral Cortex*, 26(6), 2800–2810. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv141>
- Niewiadomski, P., Niedziolka, S. M., Markiewicz, L., Uspienski, T., Baran, B., & Chojnowska, K. (2019). Gli proteins: Regulation in development and cancer. *Cell*, 8(2), 147. <https://doi.org/10.3390/cells8020147>
- Renaude, E., Kroemer, M., Loyon, R., Binda, D., Borg, C., Guittaut, M., ... Peixoto, P. (2020). The fate of Th17 cells is shaped by epigenetic modifications and remodeled by the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1673. <https://doi.org/10.3390/ijms21051673>
- Ribbons, K. A., McElduff, P., Boz, C., Trojano, M., Izquierdo, G., Duquette, P., ... Lechner-Scott, J. (2015). Male sex is independently associated with faster disability accumulation in relapse-onset MS but not in primary progressive MS. *PLoS One*, 10(6), e0122686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122686>
- Ruiz-Palmero, I., Ortiz-Rodriguez, A., Melcangi, R. C., Caruso, D., Garcia-Segura, L. M., Rune, G. M., & Arevalo, M. A. (2016). Oestradiol synthesized by female neurons generates sex differences in neurogenesis. *Scientific Reports*, 6, 31891. <https://doi.org/10.1038/srep31891>
- Sagner, A., & Briscoe, J. (2019). Establishing neuronal diversity in the spinal cord: A time and a place. *Development*, 146(22), dev182154. <https://doi.org/10.1242/dev.182154>
- Samanta, J., Grund, E. M., Silva, H. M., Lafaille, J. J., Fishell, G., & Salzer, J. L. (2015). Inhibition of Gli1 mobilizes endogenous neural stem cells for remyelination. *Nature*, 526(7573), 448–452. <https://doi.org/10.1038/nature14957>
- Sellers, K. J., Denley, M. C. S., Saito, A., Foster, E. M., Salgarella, I., Delogu, A., ... Srivastava, D. P. (2020). Brain-synthesized oestrogens regulate cortical migration in a sexually divergent manner. *The European Journal of Neuroscience*, 52(1), 2646–2663. <https://doi.org/10.1111/ejn.14755>
- Shiina, H., Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J., Takemasa, S., ... Kato, S. (2006). Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), 224–229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506736102>
- Singh, V. B., Singh, M. V., Gorantla, S., Poluektova, L. Y., & Maggirwar, S. B. (2016). Smoothed agonist reduces human immunodeficiency virus Type-1-induced blood-brain barrier breakdown in humanized mice. *Scientific Reports*, 6, 26876. <https://doi.org/10.1038/srep26876>
- Terry, R. L., Ifergan, I., & Miller, S. D. (2016). Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Methods in Molecular Biology*, 1304, 145–160. https://doi.org/10.1007/7651_2014_88
- Tong, C. K., Fuentealba, L. C., Shah, J. K., Lindquist, R. A., Ihrle, R. A., Guinto, C. D., ... Alvarez-Buylla, A. (2015). A dorsal SHH-dependent domain in the V-SVZ produces large numbers of Oligodendroglial lineage cells in the postnatal brain. *Stem Cell Reports*, 5(4), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.013>
- Tosetti, V., Sassone, J., Ferri, A. L. M., Taiana, M., Bedini, G., Nava, S., ... Gorio, A. (2017). Transcriptional role of androgen receptor in the expression of long non-coding RNA Sox2OT in neurogenesis. *PLoS One*, 12(7), e0180579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180579>
- Traiffort, E., Kassoussi, A., Zahaf, A., & Laouarem, Y. (2020). Astrocytes and microglia as major players of myelin production in normal and pathological conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 79. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00079>
- Traiffort, E., Zakaria, M., Laouarem, Y., & Ferent, J. (2016). Hedgehog: A key signaling in the development of the oligodendrocyte lineage. *Journal of Developmental Biology*, 4(3), 28. <https://doi.org/10.3390/jdb4030028>
- Trainor, B. C., Lin, S., Finy, M. S., Rowland, M. R., & Nelson, R. J. (2007). Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9840–9845. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701819104>



- van Zwam, M., Huizinga, R., Heijmans, N., van Meurs, M., Wierenga-Wolf, A. F., Melief, M. J., ... Laman, J. D. (2009). Surgical excision of CNS-draining lymph nodes reduces relapse severity in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Pathology*, 217(4), 543–551. <https://doi.org/10.1002/path.2476>
- Voskuhl, R. R., Itoh, N., Tassoni, A., Matsukawa, M. A., Ren, E., Tse, V., ... Itoh, Y. (2019). Gene expression in oligodendrocytes during remyelination reveals cholesterol homeostasis as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20), 10130–10139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821306116>
- Winkler, C. C., Yabut, O. R., Fregoso, S. P., Gomez, H. G., Dwyer, B. E., Pleasure, S. J., & Franco, S. J. (2018). The dorsal wave of neocortical Oligodendrogenesis begins embryonically and requires multiple sources of sonic hedgehog. *The Journal of Neuroscience*, 38(23), 5237–5250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3392-17.2018>
- Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., & Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00026>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., ... Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Zakaria, M., Ferent, J., Hristovska, I., Laouarem, Y., Zahaf, A., Kassoussi, A., ... Traiffort, E. (2019). The Shh receptor Boc is important for myelin formation and repair. *Development*, 146(9), dev172502. <https://doi.org/10.1242/dev.172502>
- Zelante, T., Fric, J., Wong, A. Y., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Frontiers in Immunology*, 3, 161. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00161>
- Zhu, M. L., Bakhru, P., Conley, B., Nelson, J. S., Free, M., Martin, A., ... Su, M. A. (2016). Sex bias in CNS autoimmune disease mediated by androgen control of autoimmune regulator. *Nature Communications*, 7, 11350. <https://doi.org/10.1038/ncomms11350>
- Zhu, X., Frechou, M., Liere, P., Zhang, S., Pianos, A., Fernandez, N., ... Guennoun, R. (2017). A role of endogenous progesterone in stroke Cerebroprotection revealed by the neural-specific deletion of its intracellular receptors. *The Journal of Neuroscience*, 37(45), 10998–11020. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3874-16.2017>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Laouarem Y, Kassoussi A, Zahaf A, et al. Functional cooperation of the hedgehog and androgen signaling pathways during developmental and repairing myelination. *Glia*. 2021;69:1369–1392. <https://doi.org/10.1002/glia.23967>

VIII. References

1. Le Gall, S.M., et al., *Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice*. PLoS one, 2012. **7**(12): p. e52161.
2. Safya, H., et al., *Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 360.
3. Mellouk, A. and P. Bobe, *CD8(+), but not CD4(+) effector/memory T cells, express the CD44(high)CD45RB(high) phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses*. FASEB J, 2019. **33**(3): p. 3225-3236.
4. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
5. Liu, C., et al., *The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi*. Blood, 2005. **105**(1): p. 31-9.
6. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 127-35.
7. Radtke, F., H.R. MacDonald, and F. Tacchini-Cottier, *Regulation of innate and adaptive immunity by Notch*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 427-37.
8. Livak, F., et al., *Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2575-80.
9. Hirano, K., et al., *Delta-like 4-mediated Notch signaling is required for early T-cell development in a three-dimensional thymic structure*. Eur J Immunol, 2015. **45**(8): p. 2252-62.
10. Schmitt, T.M., et al., *Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 469-79.
11. Patra, A.K., et al., *An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development*. Nat Immunol, 2013. **14**(2): p. 127-35.
12. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
13. Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and D. Baltimore, *The V(D)J recombination activating gene, RAG-1*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1035-48.
14. Kreslavsky, T., et al., *beta-Selection-induced proliferation is required for alphabeta T cell differentiation*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 840-53.
15. Borowski, C., et al., *Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development*. J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 607-15.
16. Qi, C., et al., *Gamma Delta T Cells and Their Pathogenic Role in Psoriasis*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 627139.
17. Frascoli, M., et al., *Purinergic P2X7 receptor drives T cell lineage choice and shapes peripheral gammadelta cells*. J Immunol, 2012. **189**(1): p. 174-80.
18. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 377-91.
19. Takada, K., K. Kondo, and Y. Takahama, *Generation of Peptides That Promote Positive Selection in the Thymus*. J Immunol, 2017. **198**(6): p. 2215-2222.
20. Takaba, H. and H. Takayanagi, *The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus*. Trends Immunol, 2017. **38**(11): p. 805-816.
21. Bouillet, P., et al., *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1735-8.
22. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
23. Anderson, M.S. and M.A. Su, *Aire and T cell development*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(2): p. 198-206.

24. Bouillet, P., et al., *BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes*. *Nature*, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
25. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
26. Maeda, Y., et al., *S1P lyase in thymic perivascular spaces promotes egress of mature thymocytes via up-regulation of S1P receptor 1*. *Int Immunol*, 2014. **26**(5): p. 245-55.
27. Allende, M.L., et al., *Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 15396-401.
28. Handel, A.E., S.R. Irani, and G.A. Hollander, *The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease*. *Nat Rev Neurol*, 2018. **14**(12): p. 723-734.
29. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. *J Immunol*, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
30. Moran, A.E., et al., *T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse*. *J Exp Med*, 2011. **208**(6): p. 1279-89.
31. Stadinski, B.D., et al., *A temporal thymic selection switch and ligand binding kinetics constrain neonatal Foxp3(+) Treg cell development*. *Nat Immunol*, 2019. **20**(8): p. 1046-1058.
32. Hinterberger, M., et al., *Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(6): p. 512-9.
33. Derbinski, J., et al., *Pillars Article: Promiscuous Gene Expression in Medullary Thymic Epithelial Cells Mirrors the Peripheral Self*. *Nat. Immunol.* 2001. 2: 1032-1039. *J Immunol*, 2016. **196**(7): p. 2915-22.
34. Lee, H.M., et al., *A broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self*. *Immunity*, 2012. **37**(3): p. 475-86.
35. Hsieh, C.S., et al., *An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(4): p. 401-10.
36. Lio, C.W., et al., *CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors*. *J Immunol*, 2010. **184**(11): p. 6007-13.
37. Vang, K.B., et al., *Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development*. *J Immunol*, 2010. **184**(8): p. 4074-7.
38. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. *Immunity*, 2000. **12**(4): p. 431-40.
39. Millar, D.G. and P.S. Ohashi, *Central tolerance: what you see is what you don't get!* *Nat Immunol*, 2016. **17**(2): p. 115-6.
40. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 350-4.
41. Ramsey, C., et al., *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(4): p. 397-409.
42. Chen, Z., C. Benoist, and D. Mathis, *How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(41): p. 14735-40.
43. Aschenbrenner, K., et al., *Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(4): p. 351-8.
44. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 20-1.
45. Fucikova, J., et al., *Induction of Tolerance and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2393.
46. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. *EMBO J*, 2014. **33**(10): p. 1104-16.
47. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(6): p. 476-83.

48. Worbs, T., S.I. Hammerschmidt, and R. Forster, *Dendritic cell migration in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(1): p. 30-48.
49. Forster, R., et al., *Pillars Article: CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs*. Cell. 1999. **99**: 23-33. J Immunol, 2016. **196**(1): p. 5-15.
50. Jenkins, M.K., J.D. Ashwell, and R.H. Schwartz, *Allogeneic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen and chemically modified antigen-presenting cells*. J Immunol, 1988. **140**(10): p. 3324-30.
51. Fathman, C.G. and N.B. Lineberry, *Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 599-609.
52. Gonzalez-Amaro, R., et al., *Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?* Trends Mol Med, 2013. **19**(10): p. 625-32.
53. Bankovich, A.J., L.R. Shiow, and J.G. Cyster, *CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4*. J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 22328-37.
54. Shiow, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 540-4.
55. Weiss, A., et al., *The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation*. Annu Rev Immunol, 1986. **4**: p. 593-619.
56. Jenkins, M.K., et al., *CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2461-6.
57. Toyooka, K., et al., *CD28 co-stimulatory signals induce IL-2 receptor expression on antigen-stimulated virgin T cells by an IL-2-independent mechanism*. Int Immunol, 1996. **8**(2): p. 159-69.
58. Cerdan, C., et al., *Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation*. J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2255-61.
59. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
60. de Jong, E.C., et al., *Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1704-9.
61. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
62. Mellman, I., *Dendritic cells: master regulators of the immune response*. Cancer Immunol Res, 2013. **1**(3): p. 145-9.
63. Ardouin, L., et al., *Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery*. Immunity, 2016. **45**(2): p. 305-18.
64. Li, M.O. and R.A. Flavell, *Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 468-76.
65. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
66. Fife, B.T., et al., *Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1185-92.
67. Iberg, C.A. and D. Hawiger, *Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells*. J Immunol, 2020. **204**(4): p. 733-744.
68. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
69. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.

70. Malinova, D., et al., *WASp-dependent actin cytoskeleton stability at the dendritic cell immunological synapse is required for extensive, functional T cell contacts*. *J Leukoc Biol*, 2016. **99**(5): p. 699-710.
71. Al-Alwan, M.M., et al., *The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse*. *J Immunol*, 2001. **166**(3): p. 1452-6.
72. Andres, P.G., et al., *CD28 signals in the immature immunological synapse*. *J Immunol*, 2004. **172**(10): p. 5880-6.
73. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(12): p. 973-83.
74. Perregaux, D.G., et al., *ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood*. *J Immunol*, 2000. **165**(8): p. 4615-23.
75. Ferrari, D., et al., *The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release*. *J Immunol*, 2006. **176**(7): p. 3877-83.
76. Kurashima, Y., et al., *Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1034.
77. Shieh, C.H., et al., *P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-alpha in cultured mouse microglia*. *Glia*, 2014. **62**(4): p. 592-607.
78. Di, A., et al., *The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation*. *Immunity*, 2018. **49**(1): p. 56-65 e4.
79. Laudisi, F., et al., *Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1beta release*. *J Immunol*, 2013. **191**(3): p. 1006-10.
80. Walev, I., et al., *Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes*. *EMBO J*, 1995. **14**(8): p. 1607-14.
81. Swanson, K.V., M. Deng, and J.P. Ting, *The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(8): p. 477-489.
82. Barbera-Cremades, M., et al., *P2X7 Receptor Induces Tumor Necrosis Factor-alpha Converting Enzyme Activation and Release to Boost TNF-alpha Production*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 862.
83. Le Gall, S.M., et al., *ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 22): p. 3913-22.
84. Le Gall, S.M., et al., *ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(6): p. 1785-94.
85. Soare, A.Y., et al., *P2RX7 at the Host-Pathogen Interface of Infectious Diseases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2021. **85**(1).
86. Weiss, A., et al., *Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(13): p. 5484-8.
87. Ostergaard, H.L., et al., *Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(22): p. 8959-63.
88. Chan, A.C., et al., *ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain*. *Cell*, 1992. **71**(4): p. 649-62.
89. Gwack, Y., et al., *Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes*. *Cell Calcium*, 2007. **42**(2): p. 145-56.
90. Baksh, S. and S.J. Burakoff, *The role of calcineurin in lymphocyte activation*. *Semin Immunol*, 2000. **12**(4): p. 405-15.
91. Feske, S., *Calcium signalling in lymphocyte activation and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 690-702.
92. Krishna, S. and X. Zhong, *Role of diacylglycerol kinases in T cell development and function*. *Crit Rev Immunol*, 2013. **33**(2): p. 97-118.

93. Rothenberg, E.V. and S.B. Ward, *A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9358-65.
94. Schwartzberg, P.L., L.D. Finkelstein, and J.A. Readinger, *TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 284-95.
95. Wu, L.X., et al., *CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 180-94.
96. Sperling, A.I., et al., *CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3909-17.
97. Marinari, B., et al., *CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6098-103.
98. Taylor, A. and C.E. Rudd, *Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Compensates for the Lack of CD28 in the Priming of CD8(+) Cytotoxic T-Cells: Implications for anti-PD-1 Immunotherapy*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1653.
99. Beals, C.R., et al., *Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1930-4.
100. Frauwirth, K.A., et al., *The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 769-77.
101. Bour-Jordan, H., et al., *Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 180-205.
102. Collins, A.V., et al., *The interaction properties of costimulatory molecules revisited*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 201-10.
103. Schneider, H., et al., *Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1972-5.
104. Chikuma, S., J.B. Imboden, and J.A. Bluestone, *Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 129-35.
105. Darlington, P.J., et al., *Surface cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 partitions within lipid rafts and relocates to the immunological synapse under conditions of inhibition of T cell activation*. J Exp Med, 2002. **195**(10): p. 1337-47.
106. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
107. Chambers, C.A., T.J. Sullivan, and J.P. Allison, *Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 885-95.
108. Khattri, R., et al., *Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5784-91.
109. Pang, M., et al., *Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients*. Clin Exp Immunol, 2002. **129**(1): p. 160-8.
110. Liossis, S.N., et al., *Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1448-57.
111. Enyedy, E.J., et al., *Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(5): p. 1114-21.
112. Krishnan, S., et al., *Generation and biochemical analysis of human effector CD4 T cells: alterations in tyrosine phosphorylation and loss of CD3zeta expression*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3851-9.

113. Krishnan, S., et al., *The FcR gamma subunit and Syk kinase replace the CD3 zeta-chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells.* J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4189-95.
114. Solomou, E.E., et al., *Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4216-22.
115. Juang, Y.T., et al., *Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV.* J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 996-1005.
116. Koga, T., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV suppresses IL-2 production and regulatory T cell activity in lupus.* J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3490-6.
117. Kato, H. and A. Perl, *Mechanistic target of rapamycin complex 1 expands Th17 and IL-4+ CD4-CD8- double-negative T cells and contracts regulatory T cells in systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2014. **192**(9): p. 4134-44.
118. Koga, T., et al., *CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM-alpha underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance.* J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2234-45.
119. Biswas, P.S., et al., *Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice.* J Clin Invest, 2010. **120**(9): p. 3280-95.
120. Isgro, J., et al., *Enhanced rho-associated protein kinase activation in patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2013. **65**(6): p. 1592-602.
121. Li, Y., et al., *Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1938-47.
122. Satooka, H., et al., *The ERM Protein Moesin Regulates CD8(+) Regulatory T Cell Homeostasis and Self-Tolerance.* J Immunol, 2017. **199**(10): p. 3418-3426.
123. Katsuyama, T., G.C. Tsokos, and V.R. Moulton, *Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 1088.
124. Rossey, J., et al., *Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling.* Nat Immunol, 2013. **14**(1): p. 82-9.
125. Jury, E.C., et al., *Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(5): p. 1343-54.
126. Matache, C., et al., *p56lck activity and expression in peripheral blood lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.* Autoimmunity, 1999. **29**(2): p. 111-20.
127. Schuck, S., et al., *Resistance of cell membranes to different detergents.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5795-800.
128. Mayor, S. and F.R. Maxfield, *Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment.* Mol Biol Cell, 1995. **6**(7): p. 929-44.
129. Hanada, K., et al., *Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes.* J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 6254-60.
130. Levental, I., et al., *Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles.* Biochem J, 2009. **424**(2): p. 163-7.
131. Chen, X., et al., *Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition.* Biochem J, 2009. **417**(2): p. 525-33.
132. Eggeling, C., *Super-resolution optical microscopy of lipid plasma membrane dynamics.* Essays Biochem, 2015. **57**: p. 69-80.
133. Sezgin, E. and P. Schwille, *Fluorescence techniques to study lipid dynamics.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(11): p. a009803.
134. Gupta, N. and A.L. DeFranco, *Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation.* Mol Biol Cell, 2003. **14**(2): p. 432-44.
135. Sanchez, S.A., et al., *Methyl-beta-cyclodextrins preferentially remove cholesterol from the liquid disordered phase in giant unilamellar vesicles.* J Membr Biol, 2011. **241**(1): p. 1-10.

136. Mahammad, S. and I. Parmryd, *Cholesterol depletion using methyl-beta-cyclodextrin*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1232**: p. 91-102.
137. Mahammad, S., et al., *Limited cholesterol depletion causes aggregation of plasma membrane lipid rafts inducing T cell activation*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(6): p. 625-34.
138. Sarmiento, M.J., et al., *Organization of gangliosides into membrane nanodomains*. *FEBS Lett*, 2020. **594**(22): p. 3668-3697.
139. Miller-Podraza, H., R.M. Bradley, and P.H. Fishman, *Biosynthesis and localization of gangliosides in cultured cells*. *Biochemistry*, 1982. **21**(14): p. 3260-5.
140. Gouy, H., et al., *Cell calcium signaling via GM1 cell surface gangliosides in the human Jurkat T cell line*. *J Immunol*, 1994. **152**(7): p. 3271-81.
141. Wu, G., et al., *Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression*. *Diabetes*, 2011. **60**(9): p. 2341-9.
142. Dong, L., et al., *Increased expression of ganglioside GM1 in peripheral CD4+ T cells correlates soluble form of CD30 in Systemic Lupus Erythematosus patients*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 569053.
143. Zhao, J., et al., *Attenuation of interleukin 2 signal in the spleen cells of complex ganglioside-lacking mice*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 13744-7.
144. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. **18**(6): p. 361-374.
145. Lozano, M.M., et al., *Colocalization of the ganglioside G(M1) and cholesterol detected by secondary ion mass spectrometry*. *J Am Chem Soc*, 2013. **135**(15): p. 5620-30.
146. Sodt, A.J., et al., *The molecular structure of the liquid-ordered phase of lipid bilayers*. *J Am Chem Soc*, 2014. **136**(2): p. 725-32.
147. Komura, N., et al., *Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor*. *Nat Chem Biol*, 2016. **12**(6): p. 402-10.
148. Lozano, M.M., et al., *Dynamic Reorganization and Correlation among Lipid Raft Components*. *J Am Chem Soc*, 2016. **138**(31): p. 9996-10001.
149. Lin, Q. and E. London, *Transmembrane protein (perfringolysin o) association with ordered membrane domains (rafts) depends upon the raft-associating properties of protein-bound sterol*. *Biophys J*, 2013. **105**(12): p. 2733-42.
150. Diaz-Rohrer, B.B., et al., *Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(23): p. 8500-5.
151. Lingwood, D., et al., *Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity*. *Nat Chem Biol*, 2011. **7**(5): p. 260-2.
152. Sviridov, D., N. Mukhamedova, and Y.I. Miller, *Lipid rafts as a therapeutic target*. *J Lipid Res*, 2020. **61**(5): p. 687-695.
153. Gaus, K., et al., *Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation*. *J Cell Biol*, 2005. **171**(1): p. 121-31.
154. Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee, *Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(2): p. 447-61.
155. Parmryd, I., et al., *Imaging metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in T-cell GM1-enriched domains containing Ras proteins*. *Exp Cell Res*, 2003. **285**(1): p. 27-38.
156. Kabouridis, P.S., et al., *Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(3): p. 954-63.
157. Shenoy-Scaria, A.M., et al., *Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6385-92.
158. Janes, P.W., et al., *The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling*. *Semin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 23-34.
159. Kabouridis, P.S., A.I. Magee, and S.C. Ley, *S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes*. *EMBO J*, 1997. **16**(16): p. 4983-98.

160. Brameshuber, M., et al., *Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition*. Nat Immunol, 2018. **19**(5): p. 487-496.
161. Douglass, A.D. and R.D. Vale, *Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells*. Cell, 2005. **121**(6): p. 937-50.
162. Crites, T.J., et al., *TCR Microclusters pre-exist and contain molecules necessary for TCR signal transduction*. J Immunol, 2014. **193**(1): p. 56-67.
163. Lillemeier, B.F., et al., *TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 90-6.
164. Dinic, J., et al., *The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10082.
165. Zumerle, S., B. Molon, and A. Viola, *Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1467.
166. Molnar, E., et al., *Cholesterol and sphingomyelin drive ligand-independent T-cell antigen receptor nanoclustering*. J Biol Chem, 2012. **287**(51): p. 42664-74.
167. Swamy, M., et al., *A Cholesterol-Based Allosteric Model of T Cell Receptor Phosphorylation*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1091-101.
168. Deng, G.M. and G.C. Tsokos, *Cholera toxin B accelerates disease progression in lupus-prone mice by promoting lipid raft aggregation*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4019-26.
169. Krishnan, S., et al., *Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7821-31.
170. Chyu, K.Y., et al., *Cholesterol lowering modulates T cell function in vivo and in vitro*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92095.
171. Yang, W., et al., *Potentiating the antitumour response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism*. Nature, 2016. **531**(7596): p. 651-5.
172. Smith, K.A., *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. Science, 1988. **240**(4856): p. 1169-76.
173. Villarino, A.V., et al., *Helper T cell IL-2 production is limited by negative feedback and STAT-dependent cytokine signals*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 65-71.
174. Spolski, R., P. Li, and W.J. Leonard, *Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(10): p. 648-659.
175. Kidani, Y., et al., *Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2013. **14**(5): p. 489-99.
176. Glass, C.K. and K. Saijo, *Immunology: Oxysterols hold T cells in check*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 40-1.
177. Chen, W., et al., *Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice*. Cell Metab, 2007. **5**(1): p. 73-9.
178. Radhakrishnan, A., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6511-8.
179. Eberle, D., et al., *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis*. Biochimie, 2004. **86**(11): p. 839-48.
180. Bensinger, S.J., et al., *LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response*. Cell, 2008. **134**(1): p. 97-111.
181. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
182. Iezzi, G., et al., *The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization*. Eur J Immunol, 1999. **29**(12): p. 4092-101.
183. Hosken, N.A., et al., *The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1579-84.
184. Tao, X., et al., *Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 5956-63.

185. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. *Science*, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
186. Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft, *A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development*. *J Immunol*, 1996. **157**(4): p. 1350-8.
187. Thierfelder, W.E., et al., *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. *Nature*, 1996. **382**(6587): p. 171-4.
188. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(6): p. 549-57.
189. Zhu, J., et al., *The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses*. *Immunity*, 2012. **37**(4): p. 660-73.
190. Oestreich, K.J. and A.S. Weinmann, *Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(2): p. 191-5.
191. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. *Science*, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
192. Nathan, C.F., et al., *Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity*. *J Exp Med*, 1983. **158**(3): p. 670-89.
193. Zhou, F., *Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation*. *Int Rev Immunol*, 2009. **28**(3-4): p. 239-60.
194. Su, X., et al., *Interferon-gamma regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(8): p. 838-849.
195. Kovarik, P., et al., *Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation*. *EMBO J*, 1998. **17**(13): p. 3660-8.
196. Raetz, M., et al., *Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(2): p. 136-42.
197. Huang, S., et al., *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor*. *Science*, 1993. **259**(5102): p. 1742-5.
198. Snapper, C.M. and W.E. Paul, *Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production*. *Science*, 1987. **236**(4804): p. 944-7.
199. Snapper, C.M., C. Peschel, and W.E. Paul, *IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 1988. **140**(7): p. 2121-7.
200. Amsen, D., A. Antov, and R.A. Flavell, *The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(2): p. 116-24.
201. Fallon, P.G., et al., *IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13*. *Immunity*, 2002. **17**(1): p. 7-17.
202. Kopf, M., et al., *Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses*. *Nature*, 1993. **362**(6417): p. 245-8.
203. Zhang, D.H., et al., *Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21597-603.
204. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. *Cell*, 1997. **89**(4): p. 587-96.
205. Takeda, K., et al., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. *Nature*, 1996. **380**(6575): p. 627-30.
206. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. *Immunity*, 2006. **24**(2): p. 179-89.
207. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
208. Yosef, N., et al., *Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation*. *Nature*, 2013. **496**(7446): p. 461-8.
209. Brucklacher-Waldert, V., et al., *Tbet or Continued RORgammat Expression Is Not Required for Th17-Associated Immunopathology*. *J Immunol*, 2016. **196**(12): p. 4893-904.

210. Poholek, C.H., et al., *Noncanonical STAT3 activity sustains pathogenic Th17 proliferation and cytokine response to antigen*. J Exp Med, 2020. **217**(10).
211. Iwakura, Y. and H. Ishigame, *The IL-23/IL-17 axis in inflammation*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1218-22.
212. Liu, R., et al., *IL-17 Promotes Neutrophil-Mediated Immunity by Activating Microvascular Pericytes and Not Endothelium*. J Immunol, 2016. **197**(6): p. 2400-8.
213. Teng, M.W., et al., *IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 719-29.
214. Karnowski, A., et al., *B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1*. J Exp Med, 2012. **209**(11): p. 2049-64.
215. Nurieva, R.I., et al., *Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells*. Science, 2009. **325**(5943): p. 1001-5.
216. Yu, D., et al., *The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 457-68.
217. Avery, D.T., et al., *IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1767-79.
218. Crotty, S., *T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases*. Immunity, 2019. **50**(5): p. 1132-1148.
219. Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
220. DuPage, M. and J.A. Bluestone, *Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(3): p. 149-63.
221. Schenk, U., et al., *Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels*. Sci Signal, 2008. **1**(39): p. ra6.
222. Yip, L., et al., *Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1685-93.
223. Loomis, W.H., et al., *Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4590-6.
224. Klinger, A., et al., *Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells*. Int Immunol, 2009. **21**(4): p. 443-55.
225. Galkina, E., et al., *T lymphocyte rolling and recruitment into peripheral lymph nodes is regulated by a saturable density of L-selectin (CD62L)*. Eur J Immunol, 2007. **37**(5): p. 1243-53.
226. Arbones, M.L., et al., *Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice*. Immunity, 1994. **1**(4): p. 247-60.
227. Gu, B., L.J. Bendall, and 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, 1998. **92**(3): p. 946-51.
228. Hobbs, S.J. and J.C. Nolz, *Regulation of T Cell Trafficking by Enzymatic Synthesis of O-Glycans*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 600.
229. Schenk, U., et al., *ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors*. Sci Signal, 2011. **4**(162): p. ra12.
230. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 808-12.
231. De Marchi, E., et al., *The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment*. Oncogene, 2019. **38**(19): p. 3636-3650.
232. Faliti, C.E., et al., *P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, 2019. **216**(2): p. 317-336.

233. Amoroso, F., et al., *The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e370.
234. Amoroso, F., et al., *The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3beta/VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma*. Oncogene, 2015. **34**(41): p. 5240-51.
235. Beier, U.H., et al., *Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3(+) T-regulatory cell function and allograft survival*. FASEB J, 2015. **29**(6): p. 2315-26.
236. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
237. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 474-8.
238. Fung-Leung, W.P., et al., *CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells*. Cell, 1991. **65**(3): p. 443-9.
239. Nagata, S., *Fas-mediated apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 1996. **406**: p. 119-24.
240. Thiery, J., et al., *Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 770-7.
241. Keefe, D., et al., *Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 249-62.
242. Sutton, V.R., et al., *Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1403-14.
243. Adrain, C., B.M. Murphy, and S.J. Martin, *Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4663-73.
244. Barry, M., et al., *Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 3781-94.
245. Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson, *Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1597-601.
246. Segawa, K. and S. Nagata, *An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 639-650.
247. Fadok, V.A., et al., *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 551-62.
248. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
249. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
250. Marshall, D.R., et al., *Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6313-8.
251. Kaech, S.M. and R. Ahmed, *Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 415-22.
252. Veiga-Fernandes, H., et al., *Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 47-53.
253. Lalvani, A., et al., *Rapid effector function in CD8+ memory T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 859-65.
254. Barber, D.L., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 27-31.
255. DiSpirito, J.R. and H. Shen, *Quick to remember, slow to forget: rapid recall responses of memory CD8+ T cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 13-23.
256. Masopust, D., et al., *Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4875-82.

257. Homann, D., L. Teyton, and M.B. Oldstone, *Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory*. *Nat Med*, 2001. **7**(8): p. 913-9.
258. Kaech, S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(12): p. 1191-8.
259. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(5): p. 426-32.
260. Bachmann, M.F., et al., *Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L*. *J Immunol*, 2005. **175**(7): p. 4686-96.
261. Kurtulus, S., et al., *Bcl-2 allows effector and memory CD8+ T cells to tolerate higher expression of Bim*. *J Immunol*, 2011. **186**(10): p. 5729-37.
262. Liu, Z.H., et al., *Interleukin 7 signaling prevents apoptosis by regulating bcl-2 and bax via the p53 pathway in human non-small cell lung cancer cells*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(3): p. 870-81.
263. Nolz, J.C. and M.J. Richer, *Control of memory CD8(+) T cell longevity and effector functions by IL-15*. *Mol Immunol*, 2020. **117**: p. 180-188.
264. Sowell, R.T., et al., *IL-15 Complexes Induce Migration of Resting Memory CD8 T Cells into Mucosal Tissues*. *J Immunol*, 2017. **199**(7): p. 2536-2546.
265. Berard, M., et al., *IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 5018-26.
266. Mathias, C.B., et al., *IL-15-deficient mice develop enhanced allergic responses to airway allergen exposure*. *Clin Exp Allergy*, 2017. **47**(5): p. 639-655.
267. Steinert, E.M., et al., *Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance*. *Cell*, 2015. **161**(4): p. 737-49.
268. Sallusto, F., et al., *Pillars article: two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*. 1999. **401**: 708-712. *J Immunol*, 2014. **192**(3): p. 840-4.
269. Chiu, B.C., et al., *Cutting edge: Central memory CD8 T cells in aged mice are virtual memory cells*. *J Immunol*, 2013. **191**(12): p. 5793-6.
270. Mueller, S.N., et al., *Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence*. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 137-61.
271. Jameson, S.C. and D. Masopust, *Understanding Subset Diversity in T Cell Memory*. *Immunity*, 2018. **48**(2): p. 214-226.
272. Gerlach, C., et al., *The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis*. *Immunity*, 2016. **45**(6): p. 1270-1284.
273. Mackay, L.K., et al., *The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(12): p. 1294-301.
274. Mackay, L.K., et al., *Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention*. *J Immunol*, 2015. **194**(5): p. 2059-63.
275. Mackay, L.K., et al., *T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate*. *Immunity*, 2015. **43**(6): p. 1101-11.
276. Zhang, N. and M.J. Bevan, *Transforming growth factor-beta signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 687-96.
277. Schenkel, J.M., et al., *T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses*. *Science*, 2014. **346**(6205): p. 98-101.
278. Ariotti, S., et al., *T cell memory. Skin-resident memory CD8(+) T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert*. *Science*, 2014. **346**(6205): p. 101-5.
279. Schenkel, J.M., et al., *Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(5): p. 509-13.

280. Masopust, D., et al., *Pillars article: preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. *Science*. 2001. 291: 2413-2417. *J Immunol*, 2014. **192**(3): p. 845-9.
281. Harris, N.L., et al., *Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 317-26.
282. Hislop, A.D., et al., *EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 2019-29.
283. Setoguchi, R., Y. Matsui, and K. Mouri, *mTOR signaling promotes a robust and continuous production of IFN-gamma by human memory CD8+ T cells and their proliferation*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(3): p. 893-902.
284. Martin, M.D. and V.P. Badovinac, *Defining Memory CD8 T Cell*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2692.
285. Raffin, C., L.T. Vo, and J.A. Bluestone, *Treg cell-based therapies: challenges and perspectives*. *Nat Rev Immunol*, 2020. **20**(3): p. 158-172.
286. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
287. Burchill, M.A., et al., *Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 112-21.
288. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms*. *Immunity*, 2006. **25**(3): p. 455-71.
289. Ishigame, H., et al., *Excessive Th1 responses due to the absence of TGF-beta signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(17): p. 6961-6.
290. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
291. Huynh, A., et al., *Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(2): p. 188-96.
292. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(1): p. 280-90.
293. Zorn, E., et al., *IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1571-9.
294. Chaudhry, A., et al., *Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 566-78.
295. Collison, L.W., et al., *IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(12): p. 1093-101.
296. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T Cells and Human Disease*. *Annu Rev Immunol*, 2020. **38**: p. 541-566.
297. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(1): p. 48-57.
298. Joller, N., et al., *Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses*. *Immunity*, 2014. **40**(4): p. 569-81.
299. Thepmalee, C., et al., *Inhibition of IL-10 and TGF-beta receptors on dendritic cells enhances activation of effector T-cells to kill cholangiocarcinoma cells*. *Hum Vaccin Immunother*, 2018. **14**(6): p. 1423-1431.
300. Speck, S., et al., *TGF-beta signaling initiated in dendritic cells instructs suppressive effects on Th17 differentiation at the site of neuroinflammation*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e102390.
301. Strobl, H. and W. Knapp, *TGF-beta1 regulation of dendritic cells*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(15): p. 1283-90.

302. Ernst, P.B., J.C. Garrison, and L.F. Thompson, *Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 1993-8.
303. Alroqi, F.J. and T.A. Chatila, *T Regulatory Cell Biology in Health and Disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2016. **16**(4): p. 27.
304. Romano, M., et al., *Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 43.
305. Khakh, B.S. and R.A. North, *P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease*. Nature, 2006. **442**(7102): p. 527-32.
306. Burnstock, G. and C. Kennedy, *P2X receptors in health and disease*. Adv Pharmacol, 2011. **61**: p. 333-72.
307. Burnstock, G., *P2X ion channel receptors and inflammation*. Purinergic Signal, 2016. **12**(1): p. 59-67.
308. Vijayan, D., et al., *Targeting immunosuppressive adenosine in cancer*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(12): p. 765.
309. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 247-64.
310. Jacobson, K.A., et al., *Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 124.
311. Ohta, A., et al., *The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 190.
312. Lappas, C.M., J.M. Rieger, and J. Linden, *A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 1073-80.
313. Linnemann, C., et al., *Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e728-37.
314. Sauer, A.V., et al., *Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 265.
315. Lo, B., et al., *AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy*. Science, 2015. **349**(6246): p. 436-40.
316. Janman, D., et al., *Regulation of CTLA-4 recycling by LRBA and Rab11*. Immunology, 2021. **164**(1): p. 106-119.
317. Zhang, Q., et al., *LAG3 limits regulatory T cell proliferation and function in autoimmune diabetes*. Sci Immunol, 2017. **2**(9).
318. Bettini, M., et al., *Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3493-8.
319. Bouillet, P. and L.A. O'Reilly, *CD95, BIM and T cell homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 514-9.
320. Zhan, Y., et al., *Life and Death of Activated T Cells: How Are They Different from Naive T Cells?* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1809.
321. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 617-25.
322. Bosque, A., et al., *Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8+ T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss*. Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1446-53.
323. Marsden, V.S. and A. Strasser, *Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 71-105.
324. Magerus, A., C. Bercher-Brayer, and F. Rieux-Laucat, *The genetic landscape of the FAS pathway deficiencies*. Biomed J, 2021. **44**(4): p. 388-399.
325. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 180-92.
326. Nagata, S., *Fas ligand-induced apoptosis*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 29-55.

327. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
328. Larsen, B.D. and C.S. Sorensen, *The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond*. FEBS J, 2017. **284**(8): p. 1160-1170.
329. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
330. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
331. Kourtzelis, I., G. Hajishengallis, and T. Chavakis, *Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 553.
332. Fond, A.M. and K.S. Ravichandran, *Clearance of Dying Cells by Phagocytes: Mechanisms and Implications for Disease Pathogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2016. **930**: p. 25-49.
333. Kawane, K., K. Motani, and S. Nagata, *DNA degradation and its defects*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(6).
334. Arneth, B., *Systemic Lupus Erythematosus and DNA Degradation and Elimination Defects*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1697.
335. Adachi, M., R. Watanabe-Fukunaga, and S. Nagata, *Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1756-60.
336. Roths, J.B., E.D. Murphy, and E.M. Eicher, *A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice*. J Exp Med, 1984. **159**(1): p. 1-20.
337. Takahashi, T., et al., *Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand*. Cell, 1994. **76**(6): p. 969-76.
338. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 314-7.
339. Izui, S., et al., *Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice*. J Immunol, 1984. **133**(1): p. 227-33.
340. Renno, T., et al., *Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 540-7.
341. Tang, W., et al., *Bcl-3 inhibits lupus-like phenotypes in BL6/lpr mice*. Eur J Immunol, 2021. **51**(1): p. 197-205.
342. O'Reilly, L.A., et al., *Loss of c-REL but not NF-kappaB2 prevents autoimmune disease driven by FasL mutation*. Cell Death Differ, 2015. **22**(5): p. 767-78.
343. Corneth, O.B.J., et al., *Lack of IL-17 Receptor A signaling aggravates lymphoproliferation in C57BL/6 lpr mice*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4032.
344. Burnstock, G., et al., *Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut*. Br J Pharmacol, 1970. **40**(4): p. 668-88.
345. Burnstock, G., *Introduction to Purinergic Signaling*. Methods Mol Biol, 2020. **2041**: p. 1-15.
346. Di Virgilio, F., A.C. Sarti, and R. Coutinho-Silva, *Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2020. **318**(5): p. C832-C835.
347. Kawate, T., et al., *Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state*. Nature, 2009. **460**(7255): p. 592-8.
348. Karasawa, A. and T. Kawate, *Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor*. Elife, 2016. **5**.
349. Hattori, M. and E. Gouaux, *Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 207-12.
350. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
351. Burnstock, G., et al., *ATP-gated P2X receptors in health and disease*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 204.
352. Rump, A., et al., *Evolutionary Origin of the P2X7 C-ter Region: Capture of an Ancient Ballast Domain by a P2X4-Like Gene in Ancient Jawed Vertebrates*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 113.

353. Kopp, R., et al., *P2X7 Interactions and Signaling - Making Head or Tail of It*. Front Mol Neurosci, 2019. **12**: p. 183.
354. Garcia-Marcos, M., et al., *Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland*. J Lipid Res, 2006. **47**(4): p. 705-14.
355. Gonnord, P., et al., *Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts*. FASEB J, 2009. **23**(3): p. 795-805.
356. McCarthy, A.E., C. Yoshioka, and S.E. Mansoor, *Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization*. Cell, 2019. **179**(3): p. 659-670 e13.
357. Alberto, A.V., et al., *Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor?* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013. **386**(9): p. 775-87.
358. Ousingsawat, J., et al., *Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6245.
359. Sluyter, R., *The P2X7 Receptor*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1051**: p. 17-53.
360. Savio, L.E.B., et al., *The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon?* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 52.
361. Di Virgilio, F., et al., *The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation*. Immunity, 2017. **47**(1): p. 15-31.
362. Subczynski, W.K., et al., *High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review*. Cell Biochem Biophys, 2017. **75**(3-4): p. 369-385.
363. Craig, M., S.N.S. Yarrarapu, and M. Dimri, *Biochemistry, Cholesterol*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
364. Luo, J., H. Yang, and B.L. Song, *Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(4): p. 225-245.
365. Schade, D.S., L. Shey, and R.P. Eaton, *Cholesterol Review: A Metabolically Important Molecule*. Endocr Pract, 2020. **26**(12): p. 1514-1523.
366. Pochet, S., et al., *[P2X4 or P2X7: which of these two receptors is the best target to promote salivation?]*. Med Sci (Paris), 2013. **29**(5): p. 509-14.
367. Griffiths, W.J. and Y. Wang, *Oxysterol research: a brief review*. Biochem Soc Trans, 2019. **47**(2): p. 517-526.
368. Lin, C.J., et al., *Impact of cholesterol on disease progression*. Biomedicine (Taipei), 2015. **5**(2): p. 7.
369. Tabas, I., *Cholesterol in health and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 583-90.
370. Russell, D.W., *Cholesterol biosynthesis and metabolism*. Cardiovasc Drugs Ther, 1992. **6**(2): p. 103-10.
371. Cerqueira, N.M., et al., *Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview*. Biochemistry, 2016. **55**(39): p. 5483-5506.
372. Stancu, C. and A. Sima, *Statins: mechanism of action and effects*. J Cell Mol Med, 2001. **5**(4): p. 378-87.
373. Zhao, C. and K. Dahlman-Wright, *Liver X receptor in cholesterol metabolism*. J Endocrinol, 2010. **204**(3): p. 233-40.
374. Torocsik, D., A. Szanto, and L. Nagy, *Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 134-52.
375. Song, B.L., N.B. Javitt, and R.A. DeBose-Boyd, *Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 179-89.
376. Lange, Y., et al., *Effectors of rapid homeostatic responses of endoplasmic reticulum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1445-1455.
377. Cheng, D., et al., *Activation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase by cholesterol or by oxysterol in a cell-free system*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 685-95.

378. Du, X., Y.H. Pham, and A.J. Brown, *Effects of 25-hydroxycholesterol on cholesterol esterification and sterol regulatory element-binding protein processing are dissociable: implications for cholesterol movement to the regulatory pool in the endoplasmic reticulum.* J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47010-6.
379. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.* Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
380. Shimano, H. and R. Sato, *SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology.* Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(12): p. 710-730.
381. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(4): p. 431-8.
382. Jeon, H. and S.C. Blacklow, *Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor.* Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 535-62.
383. Wijers, M., J.A. Kuivenhoven, and B. van de Sluis, *The life cycle of the low-density lipoprotein receptor: insights from cellular and in-vivo studies.* Curr Opin Lipidol, 2015. **26**(2): p. 82-7.
384. Go, G.W. and A. Mani, *Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis.* Yale J Biol Med, 2012. **85**(1): p. 19-28.
385. Frolov, A., et al., *NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25517-25.
386. Mengel, E., et al., *Clinical disease progression and biomarkers in Niemann-Pick disease type C: a prospective cohort study.* Orphanet J Rare Dis, 2020. **15**(1): p. 328.
387. Seidah, N.G., et al., *PCSK9: a key modulator of cardiovascular health.* Circ Res, 2014. **114**(6): p. 1022-36.
388. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism.* Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 71-7.
389. Adorni, M.P., et al., *High Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerosis in Cardiovascular Disease: Pathophysiological Aspects and Pharmacological Perspectives.* Cells, 2021. **10**(3).
390. Frambach, S., et al., *Brothers in Arms: ABCA1- and ABCG1-Mediated Cholesterol Efflux as Promising Targets in Cardiovascular Disease Treatment.* Pharmacol Rev, 2020. **72**(1): p. 152-190.
391. Phillips, M.C., *Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux.* J Biol Chem, 2014. **289**(35): p. 24020-9.
392. Jomard, A. and E. Osto, *High Density Lipoproteins: Metabolism, Function, and Therapeutic Potential.* Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 39.
393. Kosmas, C.E., et al., *High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease.* Drugs Context, 2018. **7**: p. 212525.
394. Rader, D.J., *Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies.* J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3090-100.
395. Tosheska Trajkovska, K. and S. Topuzovska, *High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol.* Anatol J Cardiol, 2017. **18**(2): p. 149-154.
396. Ouimet, M., T.J. Barrett, and E.A. Fisher, *HDL and Reverse Cholesterol Transport.* Circ Res, 2019. **124**(10): p. 1505-1518.
397. Ayaori, M., *[Role of HDL in Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport].* Rinsho Byori, 2016. **64**(1): p. 57-65.
398. Hai, Q. and J.D. Smith, *Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase (ACAT) in Cholesterol Metabolism: From Its Discovery to Clinical Trials and the Genomics Era.* Metabolites, 2021. **11**(8).
399. Chang, T.Y., C.C. Chang, and D. Cheng, *Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase.* Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 613-38.

400. Chang, T.Y., et al., *Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(1): p. E1-9.
401. Giuliani, A.L., et al., *The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison*. *Frontiers in pharmacology*, 2017. **8**: p. 123.
402. Le Gall, S.M., et al., *ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha*. *Molecular biology of the cell*, 2009. **20**(6): p. 1785-94.
403. Kopp, R., et al., *P2X7 Interactions and Signaling - Making Head or Tail of It*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2019. **12**: p. 183.
404. Labasi, J.M., et al., *Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response*. *Journal of immunology*, 2002. **168**(12): p. 6436-45.
405. Witting, A., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(16): p. 6362-7.
406. Chen, L. and C.F. Brosnan, *Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes*. *Journal of immunology*, 2006. **176**(5): p. 3115-26.
407. Kurashima, Y., et al., *Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors*. *Nature communications*, 2012. **3**: p. 1034.
408. Faliti, C.E., et al., *P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus*. *The Journal of experimental medicine*, 2019. **216**(2): p. 317-336.
409. Schenk, U., et al., *ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors*. *Science signaling*, 2011. **4**(162): p. ra12.
410. Purvis, H.A., et al., *A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses*. *Journal of immunology*, 2014. **193**(3): p. 1142-50.
411. Li, M., et al., *The Expression of P2X7 Receptor on Th1, Th17, and Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus or Rheumatoid Arthritis and Its Correlations with Active Disease*. *Journal of immunology*, 2020. **205**(7): p. 1752-1762.
412. Fuller, S.J., et al., *Genetics of the P2X7 receptor and human disease*. *Purinergic signalling*, 2009. **5**(2): p. 257-62.
413. Xu, X.J., et al., *Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1*. *Journal of cell science*, 2012. **125**(Pt 16): p. 3776-89.
414. Adriouch, S., et al., *Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor*. *Journal of immunology*, 2002. **169**(8): p. 4108-12.
415. Elliott, J.I., J.H. McVey, and C.F. Higgins, *The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products*. *Arthritis research & therapy*, 2005. **7**(3): p. R468-75.
416. Nicke, A., et al., *A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice*. *The Journal of biological chemistry*, 2009. **284**(38): p. 25813-22.
417. Taylor, S.R., et al., *Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses*. *Journal of leukocyte biology*, 2009. **85**(6): p. 978-86.
418. Safya, H., et al., *Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 360.
419. Mellouk, A. and P. Bobé, *CD8(+), but not CD4(+) effector/memory T cells, express the CD44(high)CD45RB(high) phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses*. *FASEB journal*, 2019. **33**(3): p. 3225-3236.
420. Bonacina, F., et al., *Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation*. *Nature communications*, 2018. **9**(1): p. 3083.

421. Mailer, R.K.W., et al., *Hypercholesterolemia Enhances T Cell Receptor Signaling and Increases the Regulatory T Cell Population*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 15655.
422. Gonnord, P., et al., *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, 2009. **23**(3): p. 795-805.
423. Murrell-Lagnado, R.D., *Chapter Eight - Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol*, in *Current Topics in Membranes*, I. Levitan, Editor. 2017, Academic Press. p. 211-232.
424. Karasawa, A., et al., *The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition*. eLife, 2017. **6**.
425. Robinson, L.E., et al., *Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization*. The Journal of biological chemistry, 2014. **289**(46): p. 31983-31994.
426. Ledeen, R.W. and G. Wu, *The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature*. Trends in biochemical sciences, 2015. **40**(7): p. 407-18.
427. Hermiston, M.L., J. Zikherman, and J.W. Zhu, *CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells*. Immunological reviews, 2009. **228**(1): p. 288-311.
428. Molnar, E., et al., *Key diagnostic markers for autoimmune lymphoproliferative syndrome with molecular genetic diagnosis*. Blood, 2020. **136**(17): p. 1933-1945.
429. Perry, D., et al., *Murine models of systemic lupus erythematosus*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2011. **2011**: p. 271694.
430. Rodriguez-Rodriguez, N., et al., *Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells*. European journal of immunology, 2016. **46**(6): p. 1383-91.
431. Li, H., et al., *Systemic lupus erythematosus favors the generation of IL-17 producing double negative T cells*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 2859.
432. Hao, Z., et al., *Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 615-27.
433. Benihoud, K., et al., *MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways*. European journal of immunology, 1997. **27**(2): p. 415-20.
434. Bonardelle, D., et al., *B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice*. Journal of leukocyte biology, 2005. **78**(5): p. 1052-9.
435. Bobé, P., et al., *Fas-mediated liver damage in MRL hemopoietic chimeras undergoing lpr-mediated graft-versus-host disease*. Journal of immunology, 1997. **159**(9): p. 4197-204.
436. Bonardelle, D., et al., *Inflammatory arthropathy in MRL hematopoietic chimeras undergoing Fas mediated graft-versus-host syndrome*. The Journal of rheumatology, 2001. **28**(5): p. 956-61.
437. Izui, S., et al., *Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice*. Journal of immunology, 1984. **133**(1): p. 227-33.
438. Benihoud, K., et al., *Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain*. Oncogene, 2002. **21**(36): p. 5593-600.
439. Portales-Cervantes, L., et al., *Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Human immunology, 2010. **71**(8): p. 818-25.
440. Bobé, P., et al., *Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice*. Blood, 2006. **108**(13): p. 3967-75.
441. Kinjyo, I., et al., *Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin*. Journal of immunology, 2010. **185**(12): p. 7151-5.
442. Qui, H.Z., et al., *CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation*. Journal of immunology, 2011. **187**(7): p. 3555-64.

443. Bride, K. and D. Teachey, *Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease*. *F1000Res*, 2017. **6**: p. 1928.
444. Le Gallo, M., et al., *CD95/Fas, Non-Apoptotic Signaling Pathways, and Kinases*. *Frontiers in immunology*, 2017. **8**: p. 1216.
445. Nolz, J.C. and M.J. Richer, *Control of memory CD8(+) T cell longevity and effector functions by IL-15*. *Molecular immunology*, 2020. **117**: p. 180-188.
446. Zumwalt, T.J., et al., *Active secretion of CXCL10 and CCL5 from colorectal cancer microenvironments associates with GranzymeB+ CD8+ T-cell infiltration*. *Oncotarget*, 2015. **6**(5): p. 2981-91.
447. D'Asaro, M., et al., *Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease*. *Leukemia*, 2006. **20**(3): p. 545-7.
448. Romero, P., et al., *Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes*. *Journal of immunology*, 2007. **178**(7): p. 4112-9.
449. Jacob, N. and W. Stohl, *Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future*. *Autoimmunity*, 2010. **43**(1): p. 84-97.
450. Teachey, D.T., A.E. Seif, and S.A. Grupp, *Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)*. *Br J Haematol*, 2010. **148**(2): p. 205-16.
451. Tinhofer, I., et al., *Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1998. **91**(11): p. 4273-81.
452. Peng, S.L., J. Moselehi, and J. Craft, *Roles of interferon-gamma and interleukin-4 in murine lupus*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(8): p. 1936-46.
453. Tang, W., et al., *Bcl-3 inhibits lupus-like phenotypes in BL6/lpr mice*. *European journal of immunology*, 2020.
454. Low, J.T., et al., *Impact of loss of NF-kappaB1, NF-kappaB2 or c-REL on SLE-like autoimmune disease and lymphadenopathy in Fas(lpr/lpr) mutant mice*. *Immunology and cell biology*, 2016. **94**(1): p. 66-78.
455. Boggio, E., et al., *IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes*. *Blood*, 2014. **123**(8): p. 1178-86.
456. Kyttaris, V.C., et al., *Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice*. *Journal of immunology*, 2010. **184**(9): p. 4605-9.
457. Zhang, Z., V.C. Kyttaris, and G.C. Tsokos, *The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis*. *Journal of immunology*, 2009. **183**(5): p. 3160-9.
458. Waldmann, T.A., M.D. Miljkovic, and K.C. Conlon, *Interleukin-15 (dys)regulation of lymphoid homeostasis: Implications for therapy of autoimmunity and cancer*. *The Journal of experimental medicine*, 2020. **217**(1): p. e20191062.
459. Inoue, S., et al., *IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis*. *Journal of immunology* 2010. **184**(3): p. 1401-9.
460. Goel, R.R., et al., *Interferon lambda promotes immune dysregulation and tissue inflammation in TLR7-induced lupus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020. **117**(10): p. 5409-5419.
461. Sanjabi, S., S.A. Oh, and M.O. Li, *Regulation of the Immune Response by TGF-β: From Conception to Autoimmunity and Infection*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017. **9**(6).
462. Veldhoen, M., *Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity*. *Nat Immunol*, 2017. **18**(6): p. 612-621.

Titre : Impact du cholestérol circulant et membranaire sur les fonctions cellulaires induites par P2X7 et la sévérité de pathologies auto-immunes de type lupique

Mots clés : P2X7, Cholestérol membranaire, Lymphocytes T, auto-immunité

Résumé : Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'influence de la dynamique membranaire sur la fonctionnalité de P2X7 dans les lymphocytes T en lien avec les différences de développement du LED chez les souris lupiques MRL/lpr et B6/lpr. Ainsi, j'ai émis l'hypothèse que le taux de cholestérol circulant pourrait influencer l'organisation des microdomaines membranaires de signalisation des lymphocytes T normaux et pathologiques et être responsable des différences de sensibilité du récepteur P2X7 à l'ATP⁴⁻. J'ai donc recherché, *in vitro* et *in vivo*, l'existence de liens entre la régulation du métabolisme du cholestérol et la fonctionnalité du récepteur P2X7 selon l'état d'activation et de différenciation des lymphocytes T. Pour ce faire, j'ai mis au point les techniques de modulation et de quantification des taux de cholestérol membranaire ainsi que les protocoles permettant de déterminer la localisation du récepteur P2X7 au sein des domaines membranaires. J'ai ainsi pu démontrer, *in vitro*, sur des lignées lymphocytaires T tumorales, l'influence du taux de cholestérol membranaire, basal ou modulé, sur les fonctions cellulaires induites par le récepteur P2X7. J'ai également pu mettre en évidence, *ex vivo*, une variation des taux de cholestérol membranaire selon l'état d'activation et de différenciation des lymphocytes T normaux ou pathologiques et que ces différences impactent la fonctionnalité de P2X7. De plus, j'ai montré chez des souris normales B6 soumises à un régime enrichi en cholestérol que le taux de cholestérol membranaire des lymphocytes T et surtout leur sensibilité à l'ATP⁴⁻ est dépendante du taux de cholestérol circulant. Enfin, des traitements hypo et hyper cholestérolémiant sont actuellement réalisés pour évaluer l'impact du taux de cholestérol circulant sur la sévérité des pathologies auto-immunes des souris MRL/lpr et B6/lpr.

Title: Impact of circulating and plasma membrane cholesterol on P2X7 induced cellular responses and lupus severity

Keywords: P2X7, Membrane cholesterol, T lymphocytes, autoimmunity

Abstract: During my thesis, I focused on the influence of membrane dynamics on the functionality of P2X7 in T lymphocytes in relation to the differences in SLE development in MRL/lpr and B6/lpr lupus mice. Thus, I hypothesized that the circulating cholesterol level could influence the organization of membrane signalling microdomains of normal and pathological T cell and be responsible for the differences in sensitivity of the P2X7 receptor to ATP⁴. I therefore researched, *in vitro* and *in vivo*, the existence of links between the regulation of cholesterol metabolism and the functionality of the P2X7 receptor according to activation and differentiation state of T lymphocytes. I developed techniques for modulating and quantifying membrane cholesterol levels as well as protocols for determining the location of the P2X7 receptor within membrane domains. I was thus able to demonstrate, *in vitro*, on tumour T lymphocyte lines, the influence of the membrane cholesterol level, basal or modulated, on the cellular functions induced by the P2X7 receptor. I was also able to demonstrate, *ex vivo*, a variation in membrane cholesterol levels depending on activation and differentiation state of normal or pathological T lymphocytes and that these differences impact the functionality of P2X7. In addition, I have shown in normal B6 mice subjected to a cholesterol-enriched diet that the membrane cholesterol level of T lymphocytes and especially their sensitivity to ATP⁴ is dependent on the circulating cholesterol level. Finally, cholesterol lowering treatments as well as cholesterol enriched diet are currently being performed to assess the impact of circulating cholesterol levels on the severity of autoimmune pathologies in MRL/lpr and B6/lpr mice.