



HAL
open science

Rôle du récepteur P2X7 dans des modèles murins de sclérose en plaques et évaluation de son potentiel en tant que nouvelle cible thérapeutique

Charlotte Guillou

► **To cite this version:**

Charlotte Guillou. Rôle du récepteur P2X7 dans des modèles murins de sclérose en plaques et évaluation de son potentiel en tant que nouvelle cible thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR073 . tel-04439538

HAL Id: tel-04439538

<https://theses.hal.science/tel-04439538>

Submitted on 5 Feb 2024

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

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



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

Role du récepteur P2X7 dans des modèles murins de sclérose en plaques et évaluation de son potentiel en tant que nouvelle cible thérapeutique

Présentée et soutenue par
CHARLOTTE GUILLOU

Thèse soutenue le 12/09/2023
devant le jury composé de :

M. ERIC BOUE-GRABOT	Directeur de Recherche - UNIVERSITE DE BORDEAUX	Rapporteur du jury
MME CECILE DELARASSE	Chargé de Recherche - SORBONNE UNIVERSITE	Rapporteur du jury
M. THIERRY AMEDEE	Directeur de Recherche - UNIVERSITE DE BORDEAUX	Membre du jury
MME LAURIANE ULMANN	Maître de Conférences HDR - UNIVERSITE DE MONTPELLIER	Membre du jury
MME ISABELLE DUBUS	Professeur des Universités - Université de Rouen Normandie	Président du jury
M. YOSSAN-VAR TAN	Maître de Conférences - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **YOSSAN-VAR TAN** (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE)

Remerciement

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Docteur Yossan-Var Tan pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de la confiance qu'il a placée en moi. Merci de sa patience, du soutien et du temps qu'il m'a accordé tout au long de cette thèse notamment pendant cette période de fin de thèse. Merci au Professeur Olivier Boyer de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci au Professeur Sahil Adriouch de m'avoir intégrée dans son équipe, merci aussi pour sa gentillesse et ses conseils avisés tout au long de cette thèse. Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Docteur Catalina Abad pour ses conseils, son aide précieuse lors des manipulations, son soutien moral et sa grande disponibilité. Je souhaite aussi fortement remercier Thara et Marine pour leur soutien lors des manipulations, leur bonne humeur surtout dans ce rush de fin de thèse.

Un grand merci à mes compagnons de bureau, Sarah, Misa et Ines qui ont dû me supporter en cette fin de thèse. Merci à Sarah qui fut un petit rayon de soleil dans ce bureau dans mes moments de doutes et toujours bienveillante. Merci Misa d'être mon ami en toutes circonstances et pour ces discussions philosophiques de 16h. Merci Inès pour ces bons moments passés dans ce bureau même si cela fut court. Merci à Justine qui est présente de façon intermittente dans ce bureau pour la pause Thé. Un autre grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire INSERM U1234 pour ces 3 années qui auraient été bien différentes sans vous tous. Merci pour votre gentillesse, vos conseils bienveillants et votre bonne humeur à toute épreuve. Une mention spéciale pour Chantal Barou qui a veillé à faciliter mon quotidien dans cette aventure et un merci particulier à Marine Malleter pour son aide précieuse dans la réalisation de mon projet futur.

Au terme de ce parcours, je remercie ma famille qui m'a apportée un soutien sans faille tout au long de cette thèse et dans mes projets. Merci Maman pour ta patience, pour tes encouragements et un énorme merci d'avoir accepté de corriger ce manuscrit. Merci à mon père et à mon frère Edouard qui m'ont soutenu et souvent m'ont redonné de l'énergie pour finir cette thèse.

Enfin je remercie le Dr. Eric Bouet-Grabot, le Dr. Cécile Delarasse, le Dr. Thierry Amédée, le Dr. Laurianne Ullmann et le Dr. Isabelle Dubus d'avoir accepté de prendre part à ce jury

Je tiens tous à vous remercier une dernière fois pour cette expérience qui m'a permis de progresser tant intellectuellement qu'émotionnellement. Je ne suis plus la même personne qu'avant mon arrivée et c'est en partie grâce à chacun d'entre vous que je suis arrivée à la fin de ce cursus.

Table des matières

I. Introduction	1
Chapitre 1 : La sclérose en plaques	2
1.1 Symptômes, formes cliniques et diagnostic.....	2
1.1.1 Les symptômes	2
1.1.2 Les formes cliniques de la SEP.....	3
1.1.3 Diagnostic.....	4
1.2 Épidémiologie de la SEP.....	5
1.3 Les facteurs de risques	5
1.3.1 Les facteurs génétiques.....	6
1.3.2 Les facteurs environnementaux.....	6
1.4 Physiopathologie de la SEP.....	9
1.4.1 Immuno-privilège versus immuno-surveillance en situation physiologique.....	9
1.4.2 Physiopathologie de la SEP.....	19
1.5 Les modèles animaux.....	32
1.5.1 Généralités.....	32
1.5.2 Le modèle de Theiler	33
1.5.3 L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).....	33
1.5.4 Le modèle de démyélinisation induite par la toxine de la Cuprizone	36
1.6 Les traitements	38
Chapitre 2. Le récepteur P2X7	42
2.1 Les généralités	42
2.1.1 Découverte.....	43
2.1.2 Les récepteurs ionotropiques P2X et P2RX7.....	44
2.1.3 Les sources d'activation et de modulation	46
2.2 La structure et l'expression du récepteur P2X7.....	48
2.2.1 Structure	48
2.2.2 Distribution tissulaire et cellulaire.....	51
2.2.3 Polymorphisme et Variants de P2RX7.....	52
2.3 Fonctions du récepteur P2X7	54
2.3.1 Voies de signalisation	54
2.3.2 Rôle dans l'inflammation.....	59
2.3.2.2 P2RX7 et les maladies inflammatoires et/ou auto-immunes	59
2.3.3 Rôle dans le système nerveux	62
Chapitre 3. Développement et validation de la méthodologie AAVnano	70
3.1 Modulation de l'activité de P2RX7 en utilisant des agents pharmacologiques	70
3.1.1 Activation de P2RX7.....	70
3.1.2 Inhibition de P2RX7	71
3.2 Les modulateurs biologiques : des anticorps vers les nanocorps.....	72
3.3 La méthodologie AAVnano	75
3.3.1 Les AAV	76
3.3.2 Validation de la méthodologie AAVnano	80
II. Objectifs	83
III. Résultats	85
IV. Discussion et perspectives	217
V. Bibliographie	228
Résumé	256
Abstract	256

Liste des Tableaux

Tableau 1 : score EAE associés aux signes cliniques	35
--	-----------

Tableau 2 : Les récepteurs P2X	43
Tableau 3 : Les récepteurs P2Y	44
Tableau 4 : Anticorps monoclonaux modulant la fonction de P2RX7 :	73
Tableau 5 : Tropismes des différents sérotypes des AAV et leurs origines.	79

Liste des Figures

Figure 1 : Évolution et symptômes hétérogènes de la SEP.	4
Figure 2 : Les barrières du système nerveux central (SNC) et leur milieu immunologique.	12
Figure 3 : Drainage des fluides dans le cerveau et cellules myéloïdes associées au SNC.	14
Figure 4 : Extravasation et migration transendothéliale des leucocytes.	15
Figure 5 : Accès méningé et parenchymateux des cellules immunitaires.	17
Figure 6 : Rôles des lymphocytes T dans l'homéostasie du SNC.	18
Figure 7 : Rôles de la microglie dans le SNC.	19
Figure 8 : Génération de lymphocytes T autoréactifs à la périphérie.	21
Figure 9 : Physiopathologie de la sclérose en plaques durant les phases précoce et tardive.	31
Figure 10 : Caractéristiques du modèle cuprizone.	37
Figure 11 : Les différents mécanismes d'action des DMT.	42
Figure 12 : Voies de signalisation intracellulaire du récepteur P2X7.	45
Figure 13 : Structure du P2RX7.	50
Figure 14 : Les variants d'épissage du P2RX7 humain et murin.	54
Figure 15 : Voies de signalisation de P2RX7 et mécanismes d'action.	58
Figure 16 : Différences phénotypiques et fonctionnelles entre les souris GlaxoSmithKline (GSK) et Pfizer P2RX7 knock-out (KO) par rapport à leurs homologues de type sauvage (WT).	69
Figure 17 : Représentation et comparaison entre les anticorps conventionnels et les nanocorps.	75
Figure 18 : Mécanismes impliqués dans la transduction des AAV.	78
Figure 19(22): Nanocorps utilisés dans cette étude.	81
Figure 20 : Comparaison entre l'injection répétée de médicaments ou d'anticorps/nanocorps et la méthodologie AAVnano.	82

Liste des abréviations

AAP : Protéine d'activation de l'assemblage
(*assembly activating protein*)

AAV : Virus adéno-associés
(*adeno-associated virus*)

Ac : Anticorps

ACTH: Hormones corticotropes

ADAM : *A disintegrin and metalloprotease domain-containing protein*

Adv : Adénovirus

Ag : Antigène

ApoE : Apolipoprotéine E

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde soluble
(*amyloid precursor protein*)

ARSEP : L'aide à la recherche sur la sclérose en plaques

ATP : Adénosine triphosphate

ATPe: ATP extracellulaire

BBG : Bleu brillant G

BCSFB : Barrière plexus choroïde blood-cerebrospinal fluid barrier

BDNF : Facteur de croissance dérivé des nerfs
(NGF)

BHE : Barrière hématoencéphalique

BLMB : Barrière leptoméningée

Bz-ATP : Benzoylbenzoyl-ATP

CAC : Colite associé au cancer

CCL : Ligand de chimiokine CC

CCR : Récepteur CC-chimiokine

CDR : Complementary determining regions

CFA : Adjuvant complet de Freund (Freund's complete Adjuvant)

CFTR : Normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CH : Domaine constant de la chaîne lourde

CIA : Collagen induced arthritis

CL : Domaine constant de la chaîne légère

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNP : Cellules neurales progénitrices

CO : Monoxyde de carbone

CPA : Cellules présentatrice d'antigènes

CRYAB : Chaîne B cristalline α

Cuprizone : CPZ, acide

bis(cyclohexylidenehydrazide)oxalique

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*

DC : Cellules dendritiques (*dendritic cells*)

DMT : Thérapies modificatrices de la pathologies (*disease-modifying therapies*)

DNFB : L'allergène 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène

DSS : Dextran sulfate sodium

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EAN : European Academy of Neurology

EBNA1 : Epstein-Bar nuclear antigen 1

EBV : Epstein-barr virus

ECTRIMS : *European committee for treatment and research in multiple sclerosis*

EDSS : Expanded Disability Status Scale

EtBr : Bromure d'éthidium

Fab : Fragment de liaison à l'antigène (antigen binding fragment)

Fc : Fragment cristallisable, fragment crystallizable

FR : Région charpente (*framework region*)

GALT : Tissus lymphoïde associés au tube digestif (*gut-associated lymphoid tissue*)

GFAP : Protéine d'acides fibrillaires gliales

GFP : *Green fluorescent protein*

GliaCAM : Molécules d'adhésion exprimées par les cellules gliales

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

GSDM-D : Gasdermin D

GWAS : Une étude d'association à l'échelle du génome (*genome-wide association study*)

Gzm B : Granzymes B

GzmA : Granzymes A

HcAb : Ac à chaîne lourdes, heavy chain antibody

HLA : Human leukocyte antigen

HSP : Les protéines de choc thermique (*Heat shock protein*)

HVR : Région hypervariable

i.v : Intraveineuse

IBA1 : Ionized calcium-binding adapter molecule 1

i.c.v : Intracérébroventriculaire

IFN γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : *Innate lymphoid cells*

iMSMS consortium : The International Multiple Sclerosis Microbiome Study

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISF : Liquide interstitiel

ITR : Répétitions terminales inversées (*inverted terminal repeats*)

iTreg : Treg induits

JC : Virus John Cunningham

LCR : Liquide céphalo rachidien

LEMP : Leucoencéphalopathie multifocale progressive

LT α : Lymphotoxine- α

LyB : Lymphocyte B

LyT : Lymphocyte T

MA : Maladie d'alzheimer

MAIT : *Mucosal associated invariant T cells*

MAS : *Modified Asworth Scale*

MBP : Protéine basique de la myéline

MBP : *Myelin basic protein*

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein

MP : Maladie de parkinson

NAD $^{+}$: Nicotinamide adénine dinucléotide

Ncs : Nanocorps

NK : Natural killer

NO : Monoxyde d'azote

nTreg : Treg naturel

oATP : ATP oxydé

OMS : Organisation mondiale de la santé

OR : Odds ratio, le taux de côte ou de chance

P2RX7 : Récepteur P2X7

PAMP : *Pathogene Associated Molecular Pattern*

PLP : *Myelin proteolipid protein*

PNI : Lésion des nerfs périphériques (*peripheral nerves injury*)

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptor*)

rAAV : AAV recombinant

RE : Réticulum endoplasmique

RNS : Espèces réactives de l'azote

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

S1p : Sphingosine-1-phosphate

scAAV : Self complementary AAV

SCI : Syndrome cliniquement isolé

SCW : Streptococcal cell wall

SCWIS : Streptococcal cell wall induced arthritis).

SEP : Sclérose en plaques

SEP-PP : SEP progressive primaire

SEP-PS : SEP progressive secondaire

SEP-RR : SEP récurrente-rémittente

SHC : Spinal cord homogenate

SI : Système immunitaire

SJL : Souris Lambert

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SNC : Système nerveux central

SNP : Single nucleotide polymorphism

ssAAV : Single stranded AAV

TfR : Récepteur de la transferrine

TGF- β : Facteur de croissance transformant (transforming growth factor β)

Th1 : Lymphocyte T helper de type 1

Th17 : Lymphocyte T helper de type 17

Th2 : Lymphocyte T helper de type 2

TIGIT : T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TLR : Récepteur de type Toll (*Toll like receptor*)

TM : Domaine transmembranaire

TMEV-IDD : Modèle de Theiler's

TNBS : Trinitrobenzenesulfonic acid

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

TP : Toxine pertussis

Tr1 : Lymphocytes T régulateurs de type 1

Treg : Lymphocytes T régulateurs

UCSF : University of California San Francisco

VCAM1 : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1

VH : Domaine variable de la chaîne lourde

VHH : Variable heavy chain

VitD : Vitamine D

VL : Domaine variable de la chaîne légère

I. Introduction

Introduction

Chapitre 1 : La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC). C'est une pathologie hétérogène et multifactorielle à médiation immunitaire (cf. 1.5 Physiopathologie) influencée par des facteurs génétiques, mais aussi environnementaux (cf. 1.3 Étiologie). Cette pathologie entraîne une démyélinisation et une neurodégénérescence du SNC causant de sérieux handicaps physiques chez le jeune adulte et plus spécialement chez la femme. Touchant plus de 2,8 millions de personnes dans le monde (cf. 1.3 Épidémiologie de la SEP), elle représente la première cause de handicap non traumatique chez le jeune adulte ; à un âge où les personnes fondent une famille et/ou se forment une carrière. En ce sens, la maladie a un impact socio-économique important : dégradation de la qualité de vie des patients et de leurs familles au cours du temps, un taux de chômage plus important et des revenus plus faibles par rapport à la population générale. La SEP est également un fardeau important pour la société compte tenu des coûts élevés des traitements non curatifs.

Depuis les années 1300, des individus atteints d'une maladie inconnue ayant des symptômes évolutifs évoquant la SEP ont été observés (Medaer 1979). Mais, le nom « sclérose en plaques » est utilisé pour la première fois en 1868 par Jean-Marie Charcot, un neurologue français. Dans la première moitié du XIX^e siècle, Cruveilhier et Carswell sont les premiers à avoir représenté les lésions observées dans la SEP dans leur atlas d'anatomie pathologique (Compston 1988). Ce fut une étape cruciale dans l'établissement des relations clinico-pathologiques de la SEP, caractérisant ainsi la maladie comme une entité distincte. Cela a permis de lier les symptômes de la SEP avec les lésions de démyélinisation dans les tissus du système nerveux central. En 1933, Rivers *et al*, ont décrit l'un des premiers modèles expérimentaux, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (cf. 1.6 Les modèles expérimentaux), modèle largement utilisé dans la recherche.

1.1 Symptômes, formes cliniques et diagnostic

1.1.1 Les symptômes

La SEP peut provoquer un large éventail de symptômes et affecter n'importe quelle partie du corps selon les zones du SNC touchées. Dans la majorité des cas, les patients ne présentent que quelques-uns des symptômes, bien que l'évolution de la maladie soit caractéristique de la pathologie. On peut citer parmi les symptômes les plus courants : les difficultés d'élocution et de déglutition, la fatigue, les problèmes de vision, d'équilibre et de reconnaissance spatiale, les engourdissements, les picotements, les problèmes musculaires (spasme, raideur et faiblesse), les problèmes de mobilité (paralysie,

douleur,...), les problèmes cognitifs (réflexion, apprentissage et planification), la dépression et l'anxiété, les problèmes urinaires et intestinaux,...

1.1.2 Les formes cliniques de la SEP

Malgré une hétérogénéité des symptômes et de l'évolution de la pathologie entre les patients, on peut les classer en trois grands différents sous-types. La forme la plus courante (90-85% des patients) est la SEP récurrente-rémittente (SEP-RR) qui peut évoluer en forme dite SEP progressive secondaire (SEP-PS) (80% des formes de SEP-RR). La dernière est la forme progressive primaire (SEP-PP) représentant 10-15% des patients.

La SEP-RR se caractérise par un épisode initial de dysfonctionnements neurologiques appelé syndrome cliniquement isolé (SCI) qui peut durer plusieurs jours, voire semaines, suivi d'une alternance de périodes de rémission (récupération clinique, généralement totale) et de récurrence (rechute clinique) (**Figure 1, ligne noire**). Les rechutes sont liées à une inflammation et démyélinisation focale du SNC entraînant des lésions de la substance blanche, observables par imagerie par résonance magnétique (IRM). Au cours du temps, la rémission est de moins en moins importante, certainement due à une accumulation de l'invalidité et des déficits cliniques et cognitifs irréversibles. Environ une vingtaine d'années après le diagnostic, 80% des patients développent ainsi la SEP-PS : les lésions inflammatoires suivent une progression limitée alors que le déclin neurologique est alors progressif (sans phase de rémission) (**Figure 1, ligne bleue**). Ce déclin neurologique s'accompagne alors d'une accélération de la perte axonale, d'une atrophie neuronale et enfin d'une atrophie cérébrale (= diminution du volume) (**Figure 1, respectivement la ligne rouge pointillée et pleine**). Enfin, une minorité de patients, environ 10% à 15% présentent une forme de SEP dite progressive primaire (SEP-PP), plus sévère que la forme PS. Elle correspond à une forme sans rémission/rechute, mais avec un déclin progressif dès le début de la pathologie (**Figure 1 ligne bleue**).

Outre ces 3 formes de SEP, d'autres formes plus rares existent : la forme récurrente-progressive caractérisée par une dégradation constante de la fonction neurologique dès le début de la maladie (comme la SEP-PP) mais avec des rechutes occasionnelles, la forme pédiatrique qui correspond à la forme SEP-RR de l'adulte avec des phases de rémission-rechute plus rapide survenant avant 18 ans et enfin la SEP tuméfactive qui correspond à une forme où les lésions à l'IRM ressemblent à une tumeur cérébrale et qui comprend la variante de Marburg particulièrement sévère (Dendrou *et al.* 2015). On peut noter que dans la population asiatique une forme optico-spinale est considérée comme différente de la forme RR : un débat existe quant à sa classification comme un trouble du spectre de la neuromyéélite optique plutôt qu'une forme de sclérose en plaques (Kira *et al.* 2008).

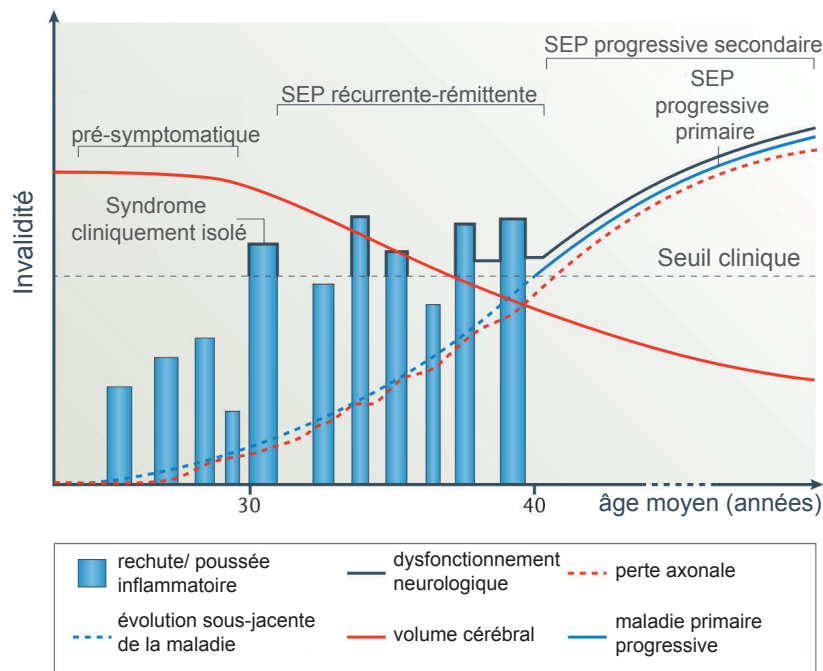


Figure 1 : Évolution et symptômes hétérogènes de la SEP. 3 grands sous-types de SEP sont reconnus. La forme la plus courante (85% des patients) est la SEP récurrente-rémittente (SEP-RR). Elle se caractérise par un épisode initial de dysfonctionnement neurologique (syndrome cliniquement isolé), suivi de périodes de rémission clinique et de rechute (ligne noire). Les rechutes coïncident avec une inflammation (histogramme bleu) et une démyélinisation focale du SNC (observable par IRM). Progressivement, l'amélioration entre les phases de rechutes diminue et l'invalidité s'accumule. Deux décennies après le diagnostic, environ 80% des patients atteints de SEP-RR développent une SEP progressive secondaire (SEP-PS). Dans la SEP-PS, le déclin neurologique (ligne noire) s'accompagne d'une perte neuronale conduisant à une atrophie du SNC illustrée par une perte du volume cérébral (respectivement, ligne rouge en pointillée et pleine). Environ 10 à 15% des patients sont atteints d'une SEP primaire progressive (SEP-PP) qui se caractérise par un déclin progressif sans rechute dès le début de la maladie (ligne bleue). D'après Dendrou et al. 2015

1.1.3 Diagnostic

Le diagnostic de la SEP est assez compliqué, car aucun test ne permet d'assurer avec certitude que le patient est atteint de la SEP, bien que les avancées notamment en imagerie aient grandement facilité ce diagnostic. Ce dernier repose sur des critères de McDonald révisés en 2017 (Thompson *et al.* 2018) qui comprennent l'examen clinique et les tests en laboratoire tels que la détection de lésions ou plaques par IRM illustrant les dommages tissulaires ou cicatrices de la gaine de myéline dans le SNC ou la détection de bandes oligoclonales spécifiques d'IgG sur gel à partir du liquide céphalorachidien (LCR). La progression des symptômes et du handicap est évaluée de façon standardisée entre les différents pays par un score dit échelle EDSS (*Expanded Disability Status Scale*). Elle s'établit sur l'examen clinique selon différents paramètres associés à la SEP (les troubles moteurs, sensitifs, urinaires, intestinaux, visuels et cognitifs), permettant d'évaluer plusieurs fonctions neurologiques. Cela permet d'obtenir une note sur 10 où plus le score est élevé, plus le handicap induit par la SEP est important. L'EDSS peut être complété par d'autres échelles comme celles évaluant la fatigue (*Fatigue*

Severity Scale), la spasticité/tonus musculaire (*MAS : Modified Asworth Scale*) ou la qualité de vie (questionnaire SEP 59) (Inojosa *et al.* 2020).

1.2 Épidémiologie de la SEP

L'Atlas de la sclérose en plaques (<https://www.atlasofms.org/>) a été créé en 2008, en collaboration avec l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) dans le but de regrouper les informations sur la SEP du monde entier. En 2020, la dernière édition a été établie sur la collecte de données dans 115 pays couvrant 87% de la population mondiale. Cette étude épidémiologique a permis de donner une estimation de 2,8 millions de personnes vivant avec la SEP dans le monde à ce jour, soit l'équivalent d'une personne sur 3 000. Cela peut monter dans les pays avec la plus forte prévalence à une personne sur 300. Ainsi, toutes les 5 minutes, une personne dans le monde est diagnostiquée avec la SEP. On compte en France plus de 100 000 personnes atteintes de SEP, 1 million en Europe et plus de 900 000 aux États-Unis. La SEP constitue la première cause de handicap non traumatique et touche principalement le jeune adulte. Dans 70% des cas, la maladie débute de 25 à 35 ans. Néanmoins, notons qu'il existe des formes de SEP dites pédiatriques (débutant avant 18 ans) et des formes plus tardives commençant après 50 ans. Le nombre de cas de SEP pédiatrique est d'environ 30 000 personnes, mais ce nombre est en constante augmentation. La répartition de la SEP dans le monde n'est pas uniforme : elle varie énormément selon les pays et la région du monde, notamment selon la latitude. En effet, le nombre de personnes atteintes augmente dans chaque hémisphère, plus on s'éloigne de l'équateur vers les pôles. Cela serait notamment dû à l'exposition au soleil et son lien avec la vitamine D (*cf.* 1.4.2.2 Vitamine D et ensoleillement). De plus, le nombre de cas est plus important dans les pays industrialisés, touchant en particulier les personnes d'origine nord-européenne. Actuellement en France, selon la fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaques (ARSEP), l'incidence de la SEP est de 5 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, en sachant que les femmes sont majoritairement touchées et représentent 75 % des cas. Chaque année en France, 25 enfants sont diagnostiqués avec un âge moyen de 11-12 ans. Une étude a montré que la SEP réduirait l'espérance de vie d'environ 6-7 ans par rapport à la moyenne de la population générale. Il existe cependant des formes rares très agressives qui évoluent rapidement, réduisant encore plus la durée de vie (Leray *et al.* 2016).

1.3 Les facteurs de risques

Bien que l'étiologie de la SEP ne soit pas encore connue et que la maladie soit complexe et multifactorielle, des facteurs de risques ont néanmoins été identifiés. Ces facteurs variés peuvent être dits moteurs (facteurs qui alimentent et maintiennent la maladie) ou déclencheurs (un événement qui

active le processus de la maladie) (Sollid 2022). Plusieurs études supportent l'effet de la combinaison de facteurs de susceptibilité génétique et des facteurs environnementaux, entraînant une augmentation du risque de développer la SEP. Je vais ici me focaliser sur les facteurs de risques, les plus connus et qui me semblent les plus importants : les facteurs de susceptibilité génétique (impliquant des gènes issus du système immunitaire) et des facteurs environnementaux (le tabagisme, zone géographique (ensoleillement et vitamine D), hygiène de vie, microbiote et agents infectieux (EBV)) (Belbasis *et al.* 2015).

1.3.1 Les facteurs génétiques

Il existe une prédisposition génétique à la SEP qui résulte de l'association de plusieurs variants génétiques. Une étude d'association à l'échelle du génome (*genome-wide association study*, GWAS) impliquant deux consortiums de recherches internationaux (*International multiple sclerosis genetics consortium et Wellcome trust case control consortium 2011, 2013 et 2019*) a permis de confirmer le lien entre le risque de développer la SEP et certaines variations génétiques. Plus de 200 variants génétiques, associés à la maladie ont été identifiés notamment localisés au niveau du locus HLA (*human leukocyte antigen*) bien que d'autres gènes de l'immunité aient été rapportés (De Jager *et al.* 2009) Le variant HLA-DRB1*15 (HLA-DR2) qui est considéré comme le facteur génétique le plus important lié au risque de développer une SEP. En Europe du Nord, un porteur hétérozygote possède un OR (*Odds ratio*, le taux de côte ou de chance) de 2,7 et un porteur homozygote de 6,7. Il est également associé à un déclenchement précoce de la maladie et à une sévérité accrue (Ramagopalan *et al.* 2010).

Des études épidémiologiques ont montré le lien entre l'apparition de la maladie et les antécédents familiaux. Le risque de développer la SEP est 10 à 25 fois plus important s'il y avait des cas dans la famille par rapport à la population générale. Ce risque est d'autant plus important que le degré de parenté est fort. Par exemple, chez des jumeaux monozygotes, le risque de développer la maladie si l'un deux étaient atteints, est d'en moyenne 25% si ce sont des hommes et de 34 % si ce sont des femmes. Pour des individus avec un parent au 1^{er} degrés ou des frères et sœurs non jumeaux, le risque tombe à environ 3% (Ramagopalan *et al.* 2010).

1.3.2 Les facteurs environnementaux

1.3.2.1 Le tabagisme

Plusieurs méta-analyses ont montré que le tabagisme chez les personnes ayant une susceptibilité génétique augmenterait le risque de déclencher la SEP d'environ 1,5 fois (Belbasis *et al.* 2015). Bien que le mécanisme concerné ne soit toujours pas connu, plusieurs hypothèses ont été avancées. Une

de ces hypothèses est que, le tabagisme en augmentant le taux de monoxyde d'azote (NO) et de monoxyde de carbone (CO) favoriserait le développement de la SEP. En effet, les forts taux de NO causent des dommages mitochondriaux, la nécrose des oligodendrocytes et une dégénération axonale conduisant à un défaut de conduction axonale (Smith and Lassmann 2002). Le CO quant à lui perturbe l'oxygénation des tissus et peut entraîner en tant que facteur neurotoxique plusieurs conséquences : la peroxydation lipidique, l'inflammation, les réactions à médiation immunitaire, la dégénérescence de la myéline, l'apoptose et la nécrose neuronales (Shirani and Tremlett 2010).

1.3.2.2 Vitamine D et ensoleillement

Comme expliqué dans la partie 1.3 Épidémiologie de la SEP, la prévalence de la SEP varie selon la latitude, là où l'ensoleillement est le plus faible (pôle), l'incidence de la SEP augmenterait. Cette variation serait due à l'ensoleillement et au taux de vitamine D (vitD) qui y sont plus faibles. Les études épidémiologiques donnent du poids à l'hypothèse de l'effet protecteur de la vitD surtout en début de vie. Par exemple, une étude a montré qu'une exposition plus faible augmente le risque de développer une SEP chez des groupes avec une répartition géographique identique et même chez des jumeaux monozygotes. Cela s'expliquerait par le fait que le manque de vitD induirait un environnement inflammatoire propice au développement de la SEP Notamment par son rôle dans la favorisation de la différenciation en lymphocytes T régulateurs (Treg) et production d'Interleukine (IL)-10 (Alfredsson and Olsson 2019).

1.3.2.3 L'hygiène de vie et microbiote

De plus en plus d'études rapportent ainsi un effet grandissant du mode de vie et/ou de l'hygiène de vie comme un facteur de susceptibilité associé à la SEP : l'obésité, le travail en horaire décalé (surtout de nuit), la consommation d'alcool, de café ou encore de sel (Alfredsson and Olsson 2019). L'hygiène de vie influence grandement le microbiote, son effet observé sur le risque de développer une SEP pourrait donc être lié à une influence du microbiote. Le microbiote correspond à l'ensemble de micro-organismes composant le microbiome (bactéries, virus, archées et les levures). Il est présent principalement au niveau des muqueuses et sur la peau. Le plus important et le plus étudié étant le microbiote intestinal qui joue un rôle dans la modulation des réponses immunitaires, le fonctionnement cérébral ou encore la digestion. Plusieurs pathologies intestinales (les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin, MICI) ou extra-intestinales comme le diabète sont associées à un déséquilibre de ce dernier, appelé dysbiose. Dans le cas de la SEP, la plupart des preuves suggérant un lien avec le microbiote sont obtenus à partir des modèles murins. Chez des souris exemptes de germes dites germ-free : l'EAE induite est moins sévère et empêche le développement de la pathologie

dans un modèle d'EAE spontanée, suggérant un rôle des bactéries présentes dans le microbiote intestinal dans l'activation des cellules immunitaires auto-réactive contre le SNC. Ces différences observées chez les souris *germ-free* serait notamment dû à un défaut de la polarisation en lymphocytes T *helper* (Th)17 au niveau des tissus lymphoïdes associés au tube digestif (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) (Berer *et al.* 2011). De plus, si ces souris *germ-free* sont transplantés avec le microbiote de jumeau monozygote atteint de SEP ou non malades, les souris transplantées avec le microbiote des patients augmentent l'incidence de l'EAE spontanée comparée aux souris transplantées avec le microbiote du jumeau non malade (Berer *et al.* 2017) notamment dû à une réduction de la production d'IL-10. Par conséquent, le microbiote permet d'induire une neuro-inflammation en modulant la polarisation des lymphocytes T (lyT) vers des Th17 ou Tregs (Berer *et al.* 2011 ; Berer *et al.* 2017). De plus en plus de données sont disponibles chez l'Homme confirmant les données obtenues chez la souris. Le consortium UCSF (*university of california San Francisco*) a montré des différences de profils des bactéries intestinales entre les patients atteints de SEP et les individus témoins. Notamment, le microbiote des patients favoriserait la différenciation des lymphocytes T en Th1 au détriment des Tregs et aurait de ce fait un impact potentiel sur la réponse aux traitements (Cekanaviciute *et al.* 2017). Récemment, dans le cadre d'une première étude internationale du microbiome associé à la SEP, le iMSMS consortium (*the International Multiple Sclerosis Microbiome Study*) a recruté un grand nombre de patients atteints de SEP (576 non traités) à travers le monde : pour chaque patient, un témoin vivant dans le même foyer, mais non lié génétiquement a été inclus. Cette étude a permis de montrer clairement une différence de profils du microbiome intestinal des patients et des témoins (iMSMS Consortium, Zhou *et al.* 2022).

1.3.2.4 Les facteurs infectieux : le cas de l'EBV

Les infections chroniques ou récurrentes peuvent entrainer une dérégulation de la réponse immunitaire suite à une stimulation de la réponse inflammatoire prolongée pouvant potentiellement favoriser le développement de pathologies inflammatoires comme la SEP. Les agents infectieux apparaissent donc comme un facteur de risque important et pourrait potentiellement expliquer l'hétérogénéité de la SEP entre les patients. (Soldan *et al.* 2016). Le virus d'Epstein-Barr (EBV, *Human Herpes Virus 4*) communément lié à la mononucléose infectieuse, a été largement étudié. En effet, la méta-analyse de Balbasis *et al* en 2015 a mis en avant l'infection par l'EBV comme le facteur moteur et/ou déclencheur majeur dans la SEP. De plus en plus de preuves issues de données épidémiologiques, sérologiques et virologiques ont renforcé le rôle de l'EBV dans l'étiologie de la SEP, notamment en démontrant que l'infection à l'EBV serait une condition préalable à la maladie (Ascherio and Munger 2016 ; Ruprecht *et al.* 2020 ; Lanz *et al.* 2022 ; Bjornevik *et al.* 2022). En 2022, dans une étude

épidémiologique, la plus complète à ce jour, plus de 10 millions de membres du personnel de l'armée américaine ont été suivis pendant 20 ans. Les données montrent sans équivoque un risque de 32 fois plus élevé de développer une SEP chez les personnes séropositives à l'EBV par rapport aux personnes séronégatives. De façon intéressante, ce risque est encore plus élevé en cas de développement d'une mononucléose infectieuse. Ce travail n'a montré aucune association avec d'autres virus (Bjornevik *et al.* 2022). Les mécanismes induits par l'EBV favorisant la physiopathologie de la SEP ne sont pas encore très clairs, même si l'on pense tout de même que l'EBV perturbe le contrôle immunitaire *via* par exemple les lymphocytes B, cellules hôtes de l'EBV. En outre, la chronicité et/ou la récurrence d'une infection à l'EBV peut entraîner une dégradation de la réponse inflammatoire appelée *bystander activation* : cela est illustré par une diminution du seuil d'activation et donc une susceptibilité/sensibilité accrue du système immunitaire. Cet état inflammatoire peut favoriser l'apparition de réponses auto-immunes (Soldan and Lieberman 2022). Un autre mécanisme et possiblement le plus probable serait le mimétisme moléculaire avec des antigènes spécifiques du SNC. L'infection chronique à l'EBV entraîne une multiplicité de nouveaux antigènes (appelés néo-antigènes) de l'EBV. Cela pourrait permettre une réaction croisée avec les antigènes du SNC. Il a ainsi par exemple été rapporté que *l'Epstein-Bar nuclear antigen 1* (EBNA1) était responsable de l'apparition d'auto-anticorps ayant des réactions croisées par mimétisme moléculaire avec des antigènes du SNC tels que la protéine basique de la myéline (MBP) (Lunemann *et al.* 2008), l'anoctamine 2 (un canal chlorure, avec des autoanticorps présents chez les patients atteints de SEP) (Tengvall *et al.* 2019), et plus récemment des molécules d'adhésion exprimées par les cellules gliales (GliaCAM) (Lanz *et al.* 2022). En plus du mimétisme viral, l'infection virale dans les tissus périphériques induit la production de protéines de stress cellulaire telles que la chaîne B cristalline α (CRYAB) (protéine chaperonne de la famille des protéines de choc thermique qui est exprimée par les lymphocytes infectés et s'accumule dans les oligodendrocytes/myéline entraînant des réponses pro-inflammatoires « erronées » où les lymphocytes confondent cette protéine du soi avec un antigène microbien conduisant à une réaction auto-immune contre des composants du SNC telle que la myéline (van Noort *et al.* 2000). Malgré ces corrélations, le rôle pathogène des anticorps à réaction croisée issus de l'EBV ou des auto-anticorps est peu établi dans la SEP.

1.4 Physiopathologie de la SEP

1.4.1 Immuno-privilège versus immuno-surveillance en situation physiologique

Sachant sa faible capacité de régénération (faible taux mitotique), le SNC est un tissu immuno-privilège, indispensable pour limiter les dommages issus de l'inflammation. Cet état immunologique unique lui vient d'expériences de transplantations tissulaires où la tolérance aux greffons a été mise

en évidence dans ce tissu comparé à la périphérie (n'incluant pas le SNC) (Medawar 1948 ; Widner and Brundin 1988). Cela a conduit à l'époque à la conclusion que les antigènes du SNC pouvaient ainsi échapper à la reconnaissance par le système immunitaire (SI) en raison d'une absence de connexion fonctionnelle directe entre le SNC et les organes lymphoïdes secondaires (tels que les ganglions lymphatiques cervicaux, sites de mise en place de la réponse immunitaire). L'immuno-privilège du SNC est confortée selon différents facteurs. En effet, le SNC est un tissu peu accessible étant confiné dans un espace limité : le cerveau protégé par la boîte crânienne et la moelle épinière par la colonne vertébrale. De plus, la présence de 3 barrières permet de limiter le nombre de cellules circulantes issues de la périphérie ; dont en particulier les cellules immunitaires (les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes). Le SNC présente également une faible expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) suggérant une activité faible de présentation de l'antigène et une production locale riche de médiateurs anti-inflammatoires (par exemple de l'IL-10 ou du facteur de croissance transformant β (*tumor growth factor- β* , TGF- β)). Il existe ainsi 3 barrières au niveau du SNC, constituées de différentes couches allant de la lumière du vaisseau sanguin au parenchyme : la barrière hématoencéphalique (BHE), la barrière du plexus choroïde et la barrière leptoméningée. La BHE est constituée d'une couche de cellules endothéliales imperméables avec des jonctions serrées formant les vaisseaux sanguins pénétrant profondément dans le parenchyme du SNC où ils sont appelés veinules postcapillaires. Accolée à sa lame basale, on retrouve une couche d'astrocytes appelée pieds astrocytaires formant la *glia limitans* dite périvasculaire. Entre ces pieds astrocytaires et la lame base de l'endothélium, des péricytes peuvent s'y trouver de façon ectopique. C'est la barrière, la plus imperméable. La BHE produit également des facteurs qui inhibent l'activité immunitaire et empêche l'invasion leucocytaire renforçant son étanchéité (par exemple, le ligand 12 de la chimiokine CXC (CXCL12) et de l'IL-25) (**Figure 2a BHE**). La seconde barrière est localisée au niveau du plexus choroïde (*blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB*). Le plexus choroïde est situé dans les 3^e et 4^e ventricules latéraux du cerveau et permet la production de liquide céphalo-rachidien (LCR). Cette barrière est constituée d'un endothélium fenestré permettant le passage par intermittence de cellules immunitaires. Toutefois l'épendyme, l'épithélium du plexus choroïde, lui est imperméable avec des jonctions serrées. Cette barrière est considérée comme le principal site d'immuno-surveillance en étant une porte d'entrée des cellules immunitaires (**Figure 2b BCSFB**). La troisième barrière est localisée au niveau des méninges et est appelée barrière leptoméningée (BLMB). Les méninges forment les membranes qui enveloppent le cerveau et la moelle épinière. Elles sont composées de la dure-mère, et des leptoméninges composés de l'arachnoïde et de la pie-mère. Cette barrière est constituée d'une seule couche endothéliale avec des jonctions serrées imperméables situés dans ces leptoméninges dans l'espace sous-arachnoïdien rempli de LCR. Au niveau de cette barrière se trouve sous la pie-mère, au bord du parenchyme, des pieds astrocytaires formant la *glia limitans* dite

superficielle qui permet le maintien d'une immuno-surveillance liée à la barrière du plexus choroïde avec la présence notamment de CPA présentes (macrophages périvasculaires) (**Figure 2c BLMB**). Malgré tout, il existe au niveau du SNC des échanges possibles avec la périphérie. Cela permet un efflux pour repousser les substances indésirables dans la circulation sanguine et l'apport de nutriments essentiels comme le glucose ou les acides aminés. Des transports peuvent ainsi s'effectuer de manière passive pour des petites molécules (telles que l'eau, l'oxygène, l'éthanol ou le dioxyde de carbone) ou encore pour des substances lipophiles comme les hormones. Des transports plus sélectifs sont aussi présents : par exemple le transport du glucose nécessite des transporteurs actifs tels que le GLUT-1. Enfin, quelques macromolécules peuvent également pénétrer les barrières par pinocytose (Shechter *et al.* 2013).

Aujourd'hui, les données acquises au cours du temps ont montré que ce privilège immunitaire du SNC est loin d'être absolu. La découverte du réseau lymphatique intracrânien a d'ailleurs été un argument majeur à le remettre en cause. Observé dans la dure-mère (la couche, la plus externe des méninges) de souris (Louveau *et al.* 2015 ; Aspelund *et al.* 2015) et confirmé chez l'Homme (en utilisant des tissus humains post-mortems (Louveau *et al.* 2015) et par analyse IRM (Absinta *et al.* 2017), ce réseau lymphatique s'étend principalement le long des sinus transversaux et sagittaux supérieurs du cerveau et draine le LCR vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds (différents des ganglions cervicaux) (**Figure 3A**). Dans des conditions physiologiques, les échanges se font entre le liquide interstitiel (ISF) et le LCR permettant l'homéostasie à la fois des fluides et des macromolécules tels que l'albumine, les protéines du plasma, la transferrine, l'insuline, l'élimination des macromolécules, des composés hydrophiles, de déchets du parenchyme cérébral dans le LCR et les cellules immunitaires des espaces méningés et du parenchyme cérébral vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds (**Figure 3A flèches vertes**). Donc la majorité des antigènes issus du SNC sont transportés dans le LCR vers la périphérie soutenant l'idée d'un dialogue entre le SNC et le SI. Or, il est apparu que ce transport se faisait indépendamment des CPA servant, en absence d'inflammation, à maintenir la tolérance (Sage *et al.* 2018 ; Giles *et al.* 2018). La circulation de l'ISF est entraînée par la pulsation artérielle le long de la membrane basale des vaisseaux sanguins cérébraux vers les leptoméninges. Le LCR produit au niveau des ventricules recircule vers l'espace méningé sous-arachnoïdien entre la pie-mère et l'arachnoïde. Ce drainage du LCR se fait via deux voies principales : les granulations arachnoïdiennes (protrusions de l'arachnoïde formant des évaginations villeuses ou des prolongements pédiculés et fongiformes localisés dans le sinus veineux de la dure-mère) et les nerfs olfactifs qui traversent la plaque ethmoïde dans le système lymphatique. La résorption du LCR permet d'éviter un afflux de ce liquide dans les ventricules, qui pourrait engendrer une hydrocéphalie. Ces deux voies permettent au liquide cérébrospinal de sortir du crâne par le sinus veineux et d'entrer dans la circulation sanguine (**Figure 3A**).

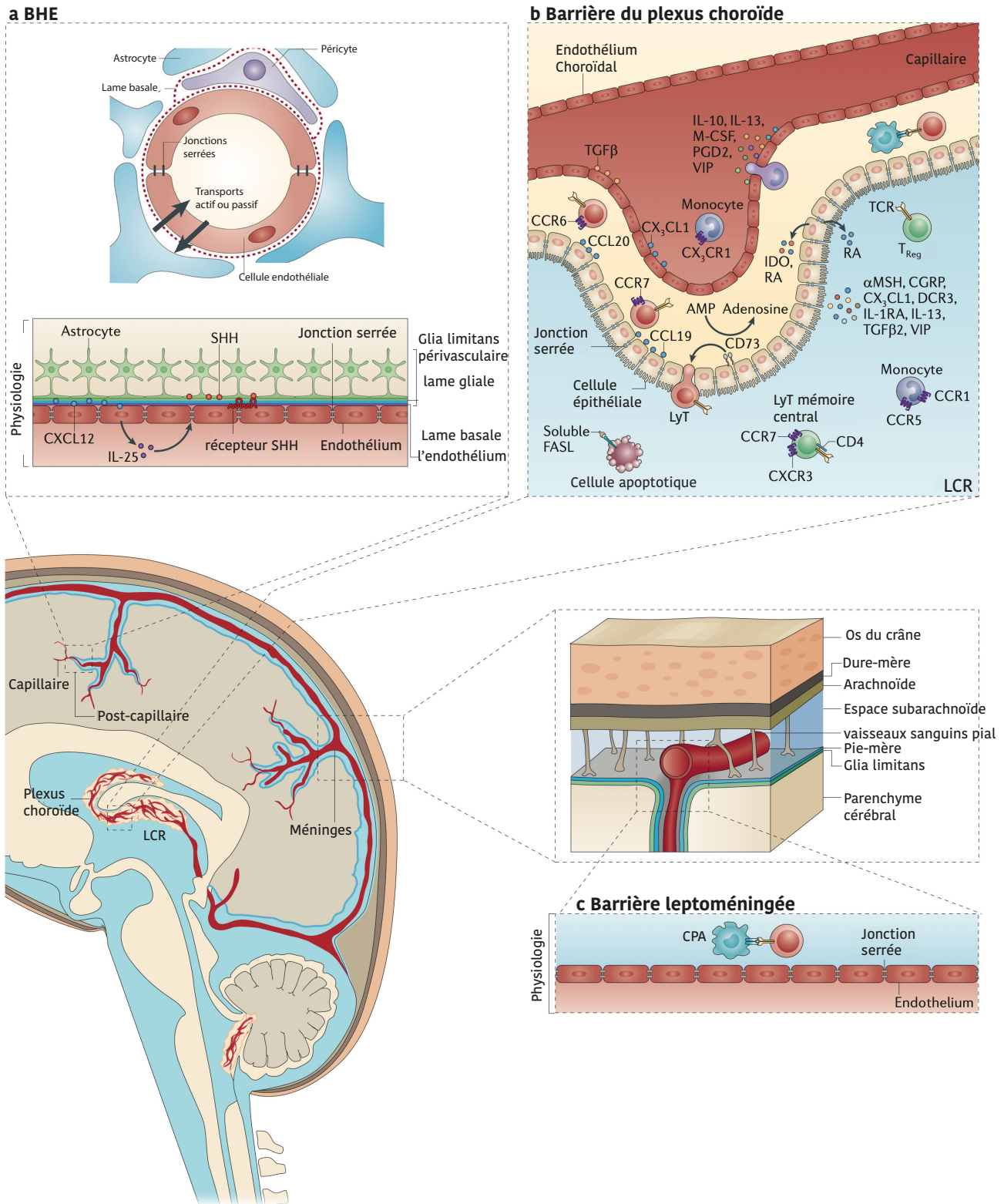


Figure 2 : Les barrières du système nerveux central (SNC) et leur milieu immunologique. a. La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure composée de cellules endothéliales étroitement connectées par des jonctions serrées formant les vaisseaux. Ces derniers pénètrent profondément dans le parenchyme du SNC : les veinules post-capillaires sont entourées par une membrane basale, des péricytes et de pieds astrocytaires formant la glia limitans périvasculaire. En condition physiologique, les mécanismes immunologiques, y compris l'expression endothéliale abluminale (couche interne) du ligand 12 de la chimiokine CXC (CXCL12) et de l'interleukine-25 (IL-25) empêchent l'invasion des

leucocytes et maintiennent l'étanchéité de la barrière. Cependant, de multiples transporteurs d'efflux sont présents pour repousser les substances indésirables dans la circulation sanguine, mais également des transporteurs d'influx pour permettre l'apport de nutriments essentiels comme le glucose ou les acides aminés. Certaines petites molécules ou des molécules lipophiles peuvent aussi diffuser passivement comme l'eau, l'oxygène, l'éthanol, le dioxyde de carbone ou les hormones. **b.** La barrière du plexus choroïde (BCSFB) est considérée comme le principal site d'immuno-surveillance du SNC. Elle est formée par un endothélium fenestré et de l'épendyme, l'épithélium du plexus choroïde. C'est la première porte d'entrée des cellules immunitaires. **c.** La barrière leptoméningée (BLM) est formée par un endothélium imperméable avec des jonctions serrées situées dans l'espace sous-arachnoïdien rempli de LCR. au niveau de cette barrière leptoméningée sous la pie-mère, au bord du parenchyme, se trouve la glia limitans superficielle. Dans des conditions physiologiques, cette structure permet le maintien d'une immuno-surveillance liée à la barrière du plexus choroïde avec la présence notamment de CPA (macrophages périvasculaires). CPA, cellule présentatrice d'antigène ; CCL, chimiokines C-C ligand ; CCR, chimiokine-C-C récepteur ; CGRP, peptide lié au gène de la calcitonine ; CX3CL1, CX3C-chimiokine ligand 1 ; CXCL, chimiokine- CXC ligand ; CXCR, récepteur au chimiokine-CXC ; DCR3, récepteur leurre 3 ; FASL, ligand de FAS ; GM-CSF, facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages ; IDO, indoleamine-2,3-dioxygénase ; IFN-g, interféron-g ; IL, interleukine ; IL-1RA, antagoniste des récepteurs de l'IL-1 ; M-CSF, facteur de stimulation des colonies de macrophages ; MMP, métalloprotéinase matricielle ; PGD2, prostaglandine D2 ; RA, acide rétinoïque ; SHH, sonic hedgehog ; TCR, récepteur des lymphocytes T ; TGFb , facteur de croissance transformant-b ; TH, T helper aussi appelé T auxiliaire ; TNF, facteur de nécrose tumorale ; Treg, T régulateurs ; VIP, peptide intestinal vasoactif. D'après Shechter et al. 2013.

La découverte de ce système lymphatique localisé au niveau du SNC soutient donc l'immuno-surveillance (Herz et al. 2017). Parmi les cellules immunitaires qui scannent le SNC, il y a notamment des macrophages périvasculaires présents près des vaisseaux sanguins et dans les méninges au niveau de la BHE dans l'espace périvasculaire (appelé l'espace de Virchow-Robin), situé le long des vaisseaux sanguins du cerveau entre la membrane basale de l'endothélium et les pieds astrocytaires. Ils jouent un rôle dans l'homéostasie et l'immuno-surveillance (**Figure 3B**). Au niveau des barrières leptoméningée et du plexus choroïde, on retrouve aussi des macrophages. Les méninges hébergent des cellules myéloïdes supplémentaires, notamment des cellules dendritiques (DC, *dendritic cells*), des monocytes, des granulocytes et mastocytes (Herz et al. 2017) (**Figure 3B**). Ces cellules myéloïdes phagocytent des débris et des intrus présents localement dans le sang et le LCR. La communication avec le système immunitaire périphérique passe donc par les vaisseaux lymphatiques méningés, où les cellules immunitaires méningées et les molécules solubles présentent au niveau du SNC s'écoulent vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds. Des cellules lymphocytaires sont également présentes et exhibent un phénotype mémoire effecteur (Baruch et al. 2013), principalement les lymphocytes Th1, Th2 et Treg (Kunis et al. 2015).

La seule cellule immunitaire résidente du SNC, présente au niveau du parenchyme nerveux, est la microglie (**Figure 3B**). Elle participe au développement des circuits neuronaux, au maintien des synapses et à la neurogenèse et la protection du SNC contre les infections et balaye activement le parenchyme (Crotti and Ransohoff 2016). Comme pour les macrophages, elle dérive du sac vitellin. En

effet, au stade embryonnaire (E9.5), la BHE n'est pas encore établie et de ce fait, les macrophages produits par ce sac vitellin peuvent donc coloniser facilement le neuroépithélium (le tissu à l'origine du SNC). À des stades de développement plus tardif, la BHE se développe en commençant par les péricytes provenant du foie fœtal, puis par la formation de pieds astrocytaires. À partir de là, la BHE est imperméable : les macrophages présents au niveau du SNC évoluent en donnant lieu à la microglie et ceux localisés en périphérie deviennent les macrophages avec leurs propres caractéristiques.

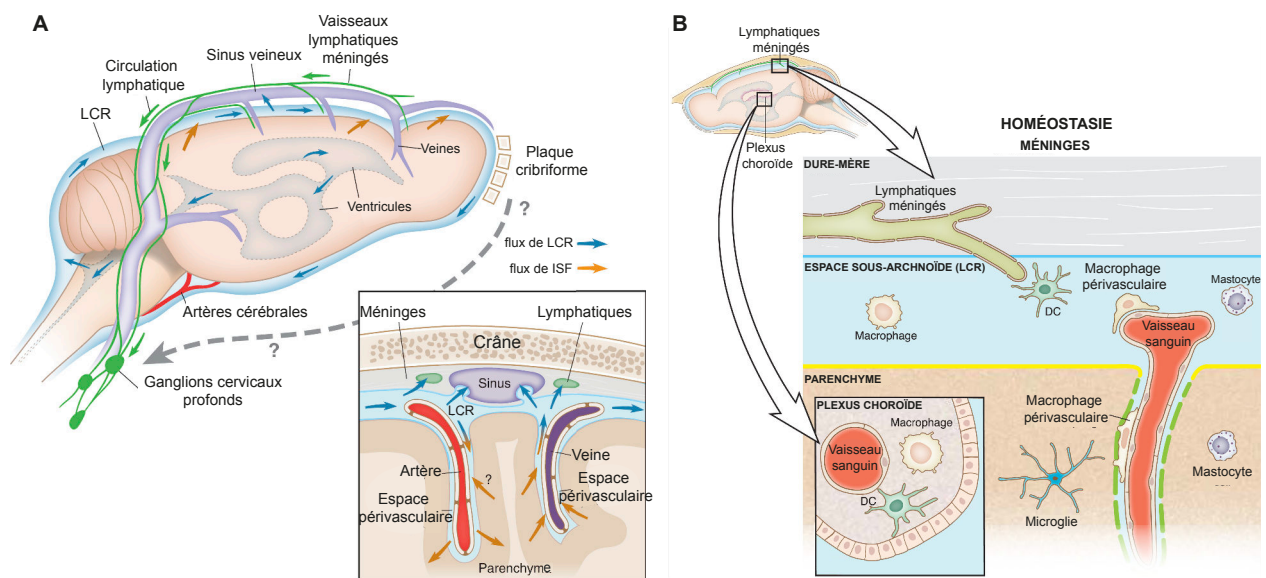


Figure 3 : Drainage des fluides dans le cerveau et cellules myéloïdes associées au SNC. **A.** Le système lymphatique résulte de l'écoulement massif paravasculaire du liquide interstitiel (ISF) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et participe à l'élimination des macromolécules et des composés hydrophiles du parenchyme cérébral dans le LCR. La circulation de l'ISF est entraînée par la pulsation artérielle le long de la membrane basale des vaisseaux sanguins cérébraux vers les leptoméninges (flèches oranges). D'autre part, le LCR recircule des ventricules cérébraux vers l'espace méningé sous-arachnoïdien entre la pie-mère et l'arachnoïde (flèches bleues). Les deux principales voies de drainage du contenu aqueux du LCR sont : (1) les granulations arachnoïdiennes localisées directement dans le sinus veineux de la dure-mère, et (2) les nerfs olfactifs traversant la plaque ethmoïde dans le système lymphatique. La circulation lymphatique méningée conventionnelle permet de drainer les macromolécules et les cellules immunitaires des espaces méningés et du parenchyme cérébral vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds (flèches vertes). **B.** Les cellules myéloïdes sont stratégiquement positionnées dans le parenchyme, près des vaisseaux sanguins et dans les méninges, où elles jouent un rôle dans l'homéostasie et l'immuno-surveillance. Alors que la microglie est située dans le parenchyme et balaye activement l'espace intra-neuronal, les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les mastocytes résident dans les méninges et le plexus choroïde. Ils y phagocytent des débris et des intrus locaux dans le sang et le LCR. La communication avec le système immunitaire périphérique se fait vraisemblablement par les vaisseaux lymphatiques méningés, à travers lesquels les cellules immunitaires méningées et les molécules solubles s'écoulent vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds. Sans ces cellules myéloïdes dans les compartiments du SNC, on observe une neurogenèse perturbée, une altération de l'intégrité de la BHE et un dysfonctionnement neuronal. Adapté de Louveau et al. 2016 et Hertz et al. 2017.

En condition physiologique, très peu de cellules immunitaires périphériques passent ces barrières, mais cela est suffisant pour permettre une immuno-surveillance du tissu nerveux. Seules les cellules

activées ou mémoires peuvent passer les barrières, dans un premier temps par la barrière la plus perméable, la barrière du plexus choroïde. Ces cellules migrent dans le SNC *via* un processus appelé extravasation. C'est un processus complexe comprenant plusieurs étapes successives dépendantes des interactions entre des molécules d'adhésion (sélectines et intégrines) et leurs ligands : le roulement (« *rolling* »), l'adhérence, la migration (ou diapédèse) et la rétention tissulaire nécessitant des signaux de « *homing* » spécifique du SNC. Les cellules immunitaires activées dans les ganglions lymphatiques sortent en empruntant la circulation sanguine. La principale molécule d'adhésion impliquée dans la migration des leucocytes (notamment les lymphocytes) vers le SNC est l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ qui interagit avec VCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales. Ces points de contact permettent aux cellules de rouler sur elles-mêmes afin de réduire leur vitesse. Si elles expriment l'intégrine/selectine adéquate qui correspond aux ligands exprimés par les cellules endothéliales, elles peuvent alors adhérer d'abord de manière faible. Par ailleurs, si les cellules immunitaires expriment les récepteurs appropriés aux chimiokines (permettant le chimiotactisme), les voies de signalisation induites permettent l'activation des intégrines (changement conformationnel) et l'adhésion aux cellules endothéliales devient alors forte. La migration transendothéliale, elle peut être paracellulaire ou transcellulaire (**Figure 4**).

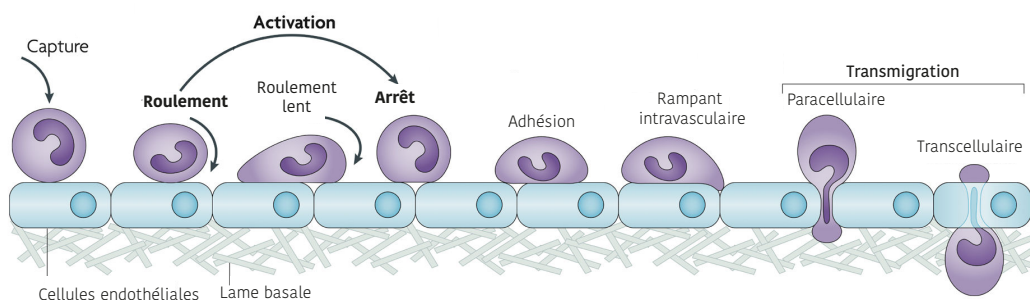


Figure 4 : Extravasation et migration transendothéliale des leucocytes. La migration transendothéliale se fait en plusieurs étapes successives dont 4 principales : (1) le roulement, qui est médié par les sélectines et les intégrines dont $\alpha 4\beta 1$ (2) l'activation, qui est médiée par les chimiokines, (3) l'adhésion médiée par les intégrines et (4) la transmigration paracellulaire ou transcellulaire. Des progrès dans la définition des étapes ont été réalisés et on peut noter qu'il y a des étapes intermédiaires comprenant la capture, le roulement lent, le renforcement, la propagation de l'adhérence et le rampage intravasculaire. D'après Ley et al. 2007.

Ce processus d'extravasation permet aux leucocytes activés ou mémoires de se retrouver au niveau de l'espace périvasculaire et se manifeste essentiellement au niveau des barrières du plexus choroïde et leptoméningée. Au niveau de la barrière du plexus choroïde, les cellules passent ainsi facilement l'endothélium fenestré puis elles peuvent, bien que les mécanismes impliqués soient mal connus, passer la couche sélective de l'épithélium (épendyme) pour se retrouver directement dans les ventricules. Elles migrent *via* le flux du LCR vers l'espace sous-arachnoïdien au niveau des méninges, où d'autres cellules peuvent arriver de la barrière leptoméningée. L'endothélium de cette barrière étant composé de jonctions serrées, un processus d'extravasation est nécessaire. Dans l'espace sous-

arachnoïdien, des CPA (DC ou macrophages) peuvent alors : réactiver les lymphocytes T effecteurs mémoires et produire des médiateurs inflammatoires (par exemple l'interféron- γ , IFN γ et l'IL-2) permettant de concourir à leurs passages si nécessaire dans le parenchyme (**Figure 5 A et B**). Comme pour le SI périphérique, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) présents régulent ce processus. Les niveaux produits d'IFN γ par exemple sont suffisants pour induire l'expression de molécules de trafic cellulaire, ne permettant qu'un faible passage de leucocytes au travers des barrières vers le LCR, afin de patrouiller dans l'espace sous-arachnoïdien du SNC sans franchir le parenchyme. Dans une situation physiologique, les cellules ne traversent pas la BHE. Cependant en condition pathologique comme dans le cas de blessures ou d'inflammations avec de fortes concentrations de cytokines pro-inflammatoires dans le LCR (Kunis *et al.* 2013), l'expression de ces molécules de trafic à la surface des cellules épithéliales augmente considérablement et cela conduit à un passage plus important des leucocytes, entraînant l'augmentation du pool de cellules immunitaires présents dans l'espace sous-arachnoïdien qui ont alors la possibilité d'atteindre le parenchyme, bien que les mécanismes impliqués ne soient pas toujours clairs. Soit les cellules s'extravasent à travers les vaisseaux méningés puis traversent la couche piale pour infiltrer le parenchyme cérébral (**Figure 5C**) ou plus vraisemblablement, l'environnement inflammatoire entraîne une augmentation de la production de cytokines et d'autres médiateurs qui, lors de leurs diffusions dans le parenchyme (à travers pia), fragilisent la BHE et permettent de recruter des cellules immunitaires périphériques à travers la BHE (**Figure 5C'**) (Kipnis 2016).

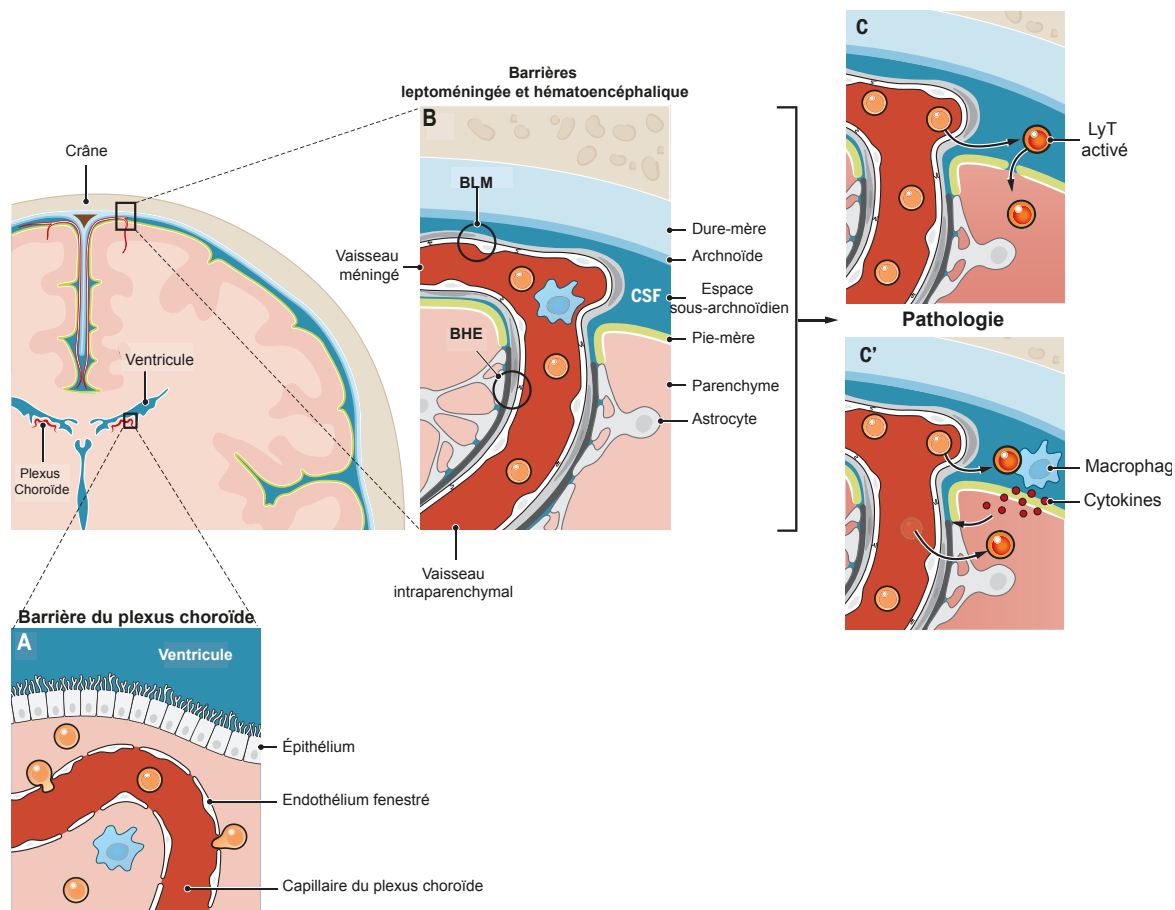


Figure 5 : Accès méningé et parenchymateux des cellules immunitaires. En condition d'homéostasie, les lymphocytes T (LyT) principalement (et d'autres cellules immunitaires) circulent dans les espaces méningés. **A** Leur site d'entrée principal se fait par la barrière du plexus choroïde, où les cellules endothéliales sont fenêtrées, ce qui permet de les traverser plus facilement. Cependant, pour que les cellules immunitaires pénètrent dans le LCR, elles doivent également traverser la barrière sélective de la couche de cellules épithéliales du plexus choroïde reliées par des jonctions serrées. Une fois dans le ventricule, les cellules immunitaires via le LCR rejoignent les méninges dans l'espace sous-arachnoïdien. **B**. Au niveau des vaisseaux sanguins méningés, les cellules immunitaires peuvent traverser la barrière leptoméningée (BLM) pour pénétrer dans l'espace sous-arachnoïdien. L'endothélium étant composé de jonctions serrées, un processus d'extravasation est nécessaire. Dans une situation physiologique, les cellules ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). **(C et C')** Cependant, dans des conditions pathologiques comme l'inflammation, le pool de cellules immunitaires présent dans l'espace sous-arachnoïdien qui arrive soit par la barrière du plexus choroïde ou leptoméningée augmente. Alors, soit **(C)** elles s'extravasent à travers les vaisseaux méningés puis traversent la couche pieale pour infiltrer le parenchyme cérébral ou **(C')** plus vraisemblablement, l'environnement inflammatoire entraîne une augmentation de la production de cytokines et d'autres médiateurs qui, lors de leur diffusion dans le parenchyme (à travers pia), fragilisent la BHE et permettent de recruter des cellules immunitaires périphériques à travers la BHE. D'après Kipnis 2016.

L'immuno-surveillance du SNC passant par ces sentinelles immunitaires permet au SNC si nécessaire de monter une solide réponse protectrice et réparatrice. Dans ce contexte, les lymphocytes T jouent trois rôles essentiels : (1) ils participent activement à l'immuno-surveillance contre les infections opportunistes telles que le virus de John Cunningham (JC), un papovavirus humain ubiquitaire généralement acquis pendant l'enfance. Ce virus opportuniste (état latent), si réactivé, est responsable

de la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) qui est une affection démyélinisante (affectant la substance blanche) du système nerveux central, entraînant des déficits neurologiques multifocaux graves et habituellement la mort dans les 9 mois. Cela a été mis en évidence lors d'altération de l'immunité à médiation cellulaire : par exemple chez les patients infectés par le VIH ou encore à la suite des traitements avec le Natalizumab, un inhibiteur sélectif de la sous-unité $\alpha 4$ des intégrines humaines fortement exprimée à la surface de tous les leucocytes. Ces deux exemples montrent l'importance des cellules immunitaires provenant de la périphérie qui permettent une immuno-surveillance essentielle au niveau du SNC (Ellwardt *et al.* 2016). (2) L'immuno-surveillance associée aux lyT joue également un rôle neuroprotecteur *via* notamment les lymphocytes Th2. Ces derniers sécrètent de l'interleukine (IL)-4 et IL-10, ainsi que le facteur neurotrophique BDNF (facteur de croissance dérivé des nerfs (NGF)). (3) Les Lymphocytes Tregs *via* leur production de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10 et TGF β) jouent un rôle important contre l'auto-immunité médiée par les lymphocytes Th1 et/ou Th17 (Figure 6).

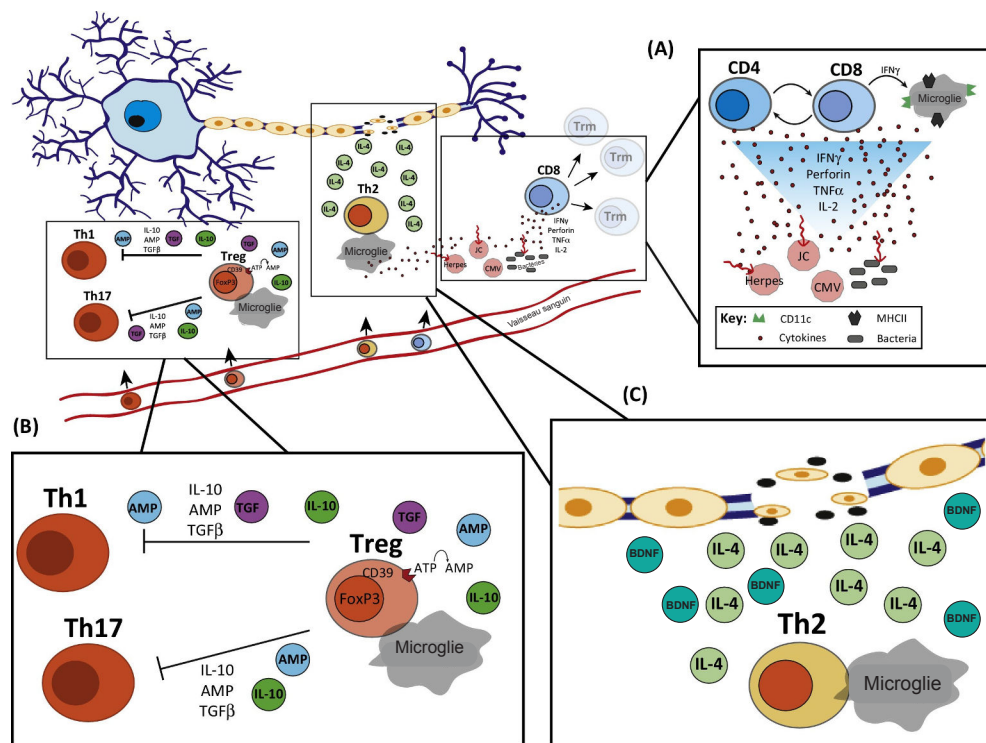


Figure 6 : Rôles des lymphocytes T dans l'homéostasie du SNC. A. Les lymphocytes T (lyT) dans la protection contre les infections opportunistes : les lyT CD4 et les lyT CD8 assurent l'immuno-surveillance du système nerveux central (SNC) en prévenant les infections opportunistes comme l'encéphalite herpétique, la toxoplasmose ou le virus JC. Les lyT aident à l'élimination des pathogènes du SNC via la production de cytokines (IFN γ et IL-2) et par l'interaction avec la microglie. Ils peuvent ensuite persister dans le SNC en tant que lyT mémoires. B. Les lyT préviennent l'auto-immunité via l'activité des lyT régulateurs (Tregs) qui modulent l'inflammation selon plusieurs mécanismes : la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , la production d'AMP via CD39 et les mécanismes contacts-dépendants via CTLA-4 et TGF- β . C. Les lyT Th2 jouent un rôle neuroprotecteur via la production de BDNF, d'IL-4 et d'IL-10. D'après Ellwardt *et al.* 2016.

En outre, la microglie joue également un rôle essentiel dans cette immuno-surveillance. Dans des conditions physiologiques, elle adopte principalement un statut quiescent sous forme étoilée pourvue de longs prolongements. Elle joue alors un rôle de surveillance principalement anti-inflammatoire. Dans cet état, la microglie participe principalement à : la phagocytose de cellules mortes/débris cellulaires, à la synaptogenèse (élagage synaptique par élimination des neurones et synapses inutiles), à l'homéostasie de la myéline, à la réparation tissulaire, au soutien de la survie des neurones et à l'amélioration de la mémoire et de l'apprentissage par des facteurs neurotrophiques (tel que le BDNF), de la neuroplasticité (**Figure 7A**). Lors de la détection de changements dans l'homéostasie cérébrale, la microglie s'active et adopte un phénotype de type pro-inflammatoire et subit des changements morphologiques et fonctionnels. Elles se rétractent rapidement et raccourcissent leurs prolongements et produit des cytokines inflammatoires et peut entraîner la destruction neuronale (**Figure 7B**).

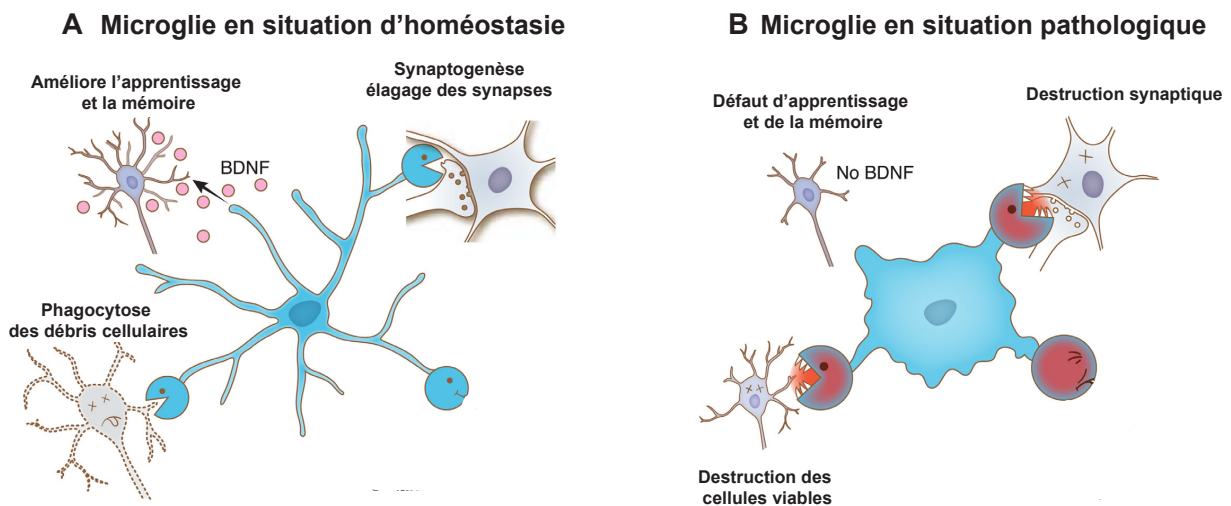


Figure 7 : Rôles de la microglie dans le SNC. A. La microglie en situation d'homéostasie exhibe un rôle de soutien neurologique médié par la sécrétion de facteurs trophiques tels que le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) et par sa participation à la synaptogenèse (élagage des synapses nécessaire à un développement normal). Leur activité phagocytaire est cruciale pour le nettoyage des cellules sénescentes et des débris. B. Dans les situations pathologiques, la microglie adopte un phénotype pro-inflammatoire entraînant une perte de la fonction synaptique, la destruction neuronale, une perte de production des facteurs trophiques. D'après Herz et al. 2017.

1.4.2 Physiopathologie de la SEP

En condition physiologique, les cellules immunitaires principalement présentes au niveau du SNC sont des Tregs permettant un contrôle des lymphocytes T autoréactifs. Si un dysfonctionnement apparaît dans ce processus, cela peut entraîner le développement de maladies auto-immunes. La SEP est caractérisée par des lésions sous forme de plaques de sclérose, causées par une infiltration massive de cellules immunitaires autoréactives responsables des processus de gliose (prolifération de cellules gliales), de démyélinisation, d'atrophie axonale et de neurodégénérescence (Frischer et al. 2009). La physiopathologie de la SEP présente deux versants : un versant immunologique et un versant

neurodégénératif. La SEP est une maladie auto-immune impliquant des lymphocytes T CD4+ auxiliaires de type 1 (Th1) et 17 (Th17) autoréactifs. Ces derniers apparaissent tôt dans la formation des lésions. La question n'est pas encore tranchée quant à savoir si la génération de lymphocytes autoréactifs se réalise à la périphérie ou localement dans le SNC. Une possibilité suggère que des événements intrinsèques au SNC déclenchent la pathologie et que l'infiltration des lymphocytes autoréactifs soit un phénomène secondaire. Une des hypothèses soulevées en ce sens est que, à la suite d'une infection virale du SNC, les mécanismes d'immuno-surveillance du SNC (cf 1.4.1 Immuno-privilege versus immuno-surveillance) entraineraient une neurodégénérescence primaire équivalente à celle observée dans la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Heneka *et al.* 2014). L'autre possibilité qui est la plus privilégiée est qu'un événement entraîne la dérégulation du système immunitaire périphérique, 3 hypothèses existent, pour expliquer cette présence de lymphocytes T autoréactifs périphériques :

- La première hypothèse est liée à un défaut des tolérances centrale et périphérique. La tolérance immunitaire s'établit de deux façons : soit de manière centrale dans le thymus, où la plupart des lymphocytes T auto-réactifs sont supprimés au moment de la sélection négative (induction de la mort des lyT CD4 et lyT CD8 présentant une réactivité avec les antigènes (Ag) du soi) ; soit par la tolérance périphérique qui permet de contrôler les cellules autoréactives ayant échappé à la sélection thymique. Ce mécanisme met en jeu principalement des lyT régulateurs (Tregs) capables d'induire la mort des lymphocytes autoréactifs. Si cette tolérance est rompue, des lymphocytes T autoréactifs (y compris des lymphocytes B autoréactifs) possiblement contre les éléments du SNC peuvent être activés à la périphérie.
- La seconde hypothèse possible est que les infections à répétition peuvent engendrer une inflammation chronique (cf. 1.3.2.5 Les facteurs infectieux). La stimulation constante du SI peut entraîner des dérégulations donnant lieu aux activations dites « *bystander* », où les lyT sont à un niveau d'activation tellement élevé qu'ils peuvent reconnaître des antigènes du soi. Ces infections récurrentes contribuent également à une multiplicité des néoantigènes viraux, augmentant ainsi les chances d'avoir un néoantigène semblable à un antigène du soi (potentiellement issu du SNC par mimétisme moléculaire) et entraînant la génération de lymphocytes T autoréactifs et la production d'anticorps avec une réactivité croisée. En outre, comme dit précédemment, de plus en plus d'études rapportent également l'implication du microbiote dans la génération des lymphocytes autoréactifs.
- La dernière hypothèse est la fuite d'antigènes issus du SNC. Comme cela a été discuté préalablement, on sait que le liquide interstitiel échange avec le LCR permettant de renouveler l'environnement du SNC et d'éliminer les déchets et les débris cellulaires. Parmi ces débris, il peut y avoir des antigènes du soi issus du SNC (tels que les constituants de la myéline) qui se retrouvent alors à la périphérie. En tant qu'organe immuno-privillégié, les Ag du SNC sont donc moins

accessibles aux mécanismes de tolérance du système immunitaire. De ce fait, les lymphocytes peuvent ainsi les reconnaître comme des antigènes du non soi (**Figure 8** ; Dendrou *et al.* 2015).

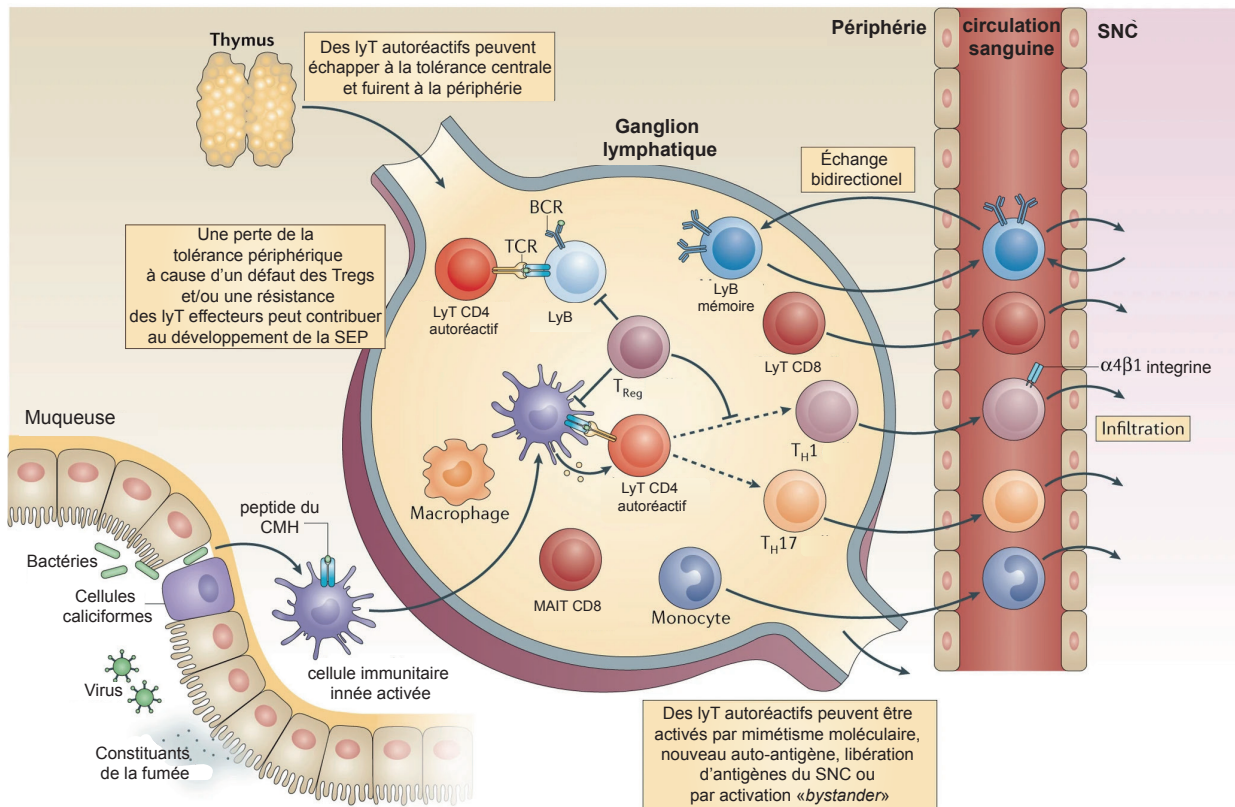


Figure 8 : Génération de lymphocytes T autoréactifs à la périphérie. Lors de l'établissement de la tolérance centrale dans le thymus, la plupart des lymphocytes T (lyT) autoréactifs sont supprimés ; cependant, ce processus est imparfait et certains lyT autoréactifs peuvent être libérés à la périphérie. Même dans ce contexte, les mécanismes de tolérance périphérique dans les ganglions lymphatiques, maintiennent ces cellules sous contrôle en induisant leur inactivité via l'action de lymphocytes T régulateurs (Treg). Si cette tolérance est rompue (due à un défaut de l'activité des Treg et/ou à la résistance aux Treg accrue des lymphocytes B (lyB) et lyT effecteurs), des lyB et lyT autoréactifs peuvent être activés à la périphérie et expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ pour alors se diriger vers le système nerveux central (SNC). De plus, des lyT ou lyB autoréactifs peuvent être activés par mimétisme moléculaire, par la variabilité accrue de nouvelle présentation d'auto-antigènes, par la reconnaissance d'antigènes séquestrés du SNC libérés dans la périphérie ou encore par une activation « bystander ». Des facteurs génétiques et environnementaux, y compris des agents infectieux et des constituants de la fumée, contribuent à ces événements. Une fois activés, les lyT CD8+, les lyT CD4+ auxiliaires 1 (Th1) et 17 (Th17) et les lyB peuvent infiltrer le SNC, entraînant une inflammation et des lésions tissulaires. Les flèches en pointillés indiquent la différenciation. BCR, récepteur des lyB ; cellules MAIT CD8+, cellules T invariantes associées à la muqueuse CD8+ ; TCR, récepteur des lymphocytes T. D'après Dendrou *et al.* 2015.

Toutes ces hypothèses vont concourir à entrainer l'activation d'un pool de cellules immunitaires autoréactives (lyT CD8+, lyT CD4+ en particulier Th1 et Th17 et lyB au niveau des organes lymphoïdes secondaires, ainsi que des cellules myéloïdes) qui vont donc pouvoir rejoindre la circulation sanguine afin de se diriger vers le SNC. Pour cela, ces cellules expriment les molécules de « homing » du SNC à savoir les intégrines $\alpha 4\beta 1$, les récepteurs aux chimiokines tels que le récepteur CC-chimiokine 6 (CCR6), CCR2 et CCR5, la glycoprotéine de surface cellulaire MUC18 (également connue sous le nom

de M-CAM), la molécule d'adhésion jonctionnelle (JAML, pour les lyTCD8) et la ninjurine 1 (pour les cellules myéloïdes) (Filippi *et al* 2018). Ces cellules autoréactives contre les éléments du SNC qui sont dites encéphalitogènes (cellules impliquées dans la destruction de la myéline) vont pouvoir, comme cela a été expliqué précédemment, par un processus d'extravasation traverser les barrières du SNC. On a ainsi deux pools de cellules immunitaires encéphalitogènes provenant des barrières du plexus choroïde et leptoméningée qui circulent dans l'espace sous-arachnoïdien au niveau des méninges, pour s'accumuler en particulier au niveau de l'espace périvasculaire. En parallèle, plus tardivement, le passage transendothéliale de cellules au niveau de la BHE contribue également à augmenter le nombre de cellules au niveau de l'espace périvasculaire. Dans le cadre des lymphocytes T, les CPA (macrophages et cellules dendritiques localisés principalement au niveau des espaces sous-arachnoïdien et périvasculaire) vont permettre une réactivation de ces cellules qui vont proliférer, se différencier. De plus, la sécrétion de différents médiateurs pro-inflammatoires vont concourir à fragiliser progressivement la BHE et entraîner sa perméabilité. Cela permettra *in fine* leur passage au travers de la dernière couche de la BHE, constituée de pieds astrocytaires (la *glia limitans*) pour se retrouver au niveau du parenchyme (**Figure 9 stade précoce**). Ces événements concourent à la formation des structures méningées de type lymphoïde tertiaire qui correspondent à un agrégat de lyT et B ressemblant à un follicule lymphoïde, qui ont été spécifiquement documentées dans la maladie progressive secondaire et qui peuvent contribuer à l'inflammation à un stade avancé chez les patients atteints de cette forme de SEP en favorisant les dommages de la *glia limitans* et la dysfonction astrocytaire (**Figure 9 stade tardif**). Par ailleurs, en fonction de la région de la BHE touchée, le point d'entrée des cellules est différent et de ce fait, donnera lieu à une multiplicité de zones d'infiltrations immunitaires (responsable des processus neurodégénératifs) qui explique les différences de symptômes entre les patients.

Dans le contexte de la SEP, les DC provenant de la périphérie ont un phénotype pro-inflammatoire avec une production accrue d'IL-12p70 et d'IL-23p19, ainsi qu'une expression accrue des récepteurs de chimiokines CCR5 et CCR7. Cela leur permet comme pour les lyT de migrer vers le SNC *via* des processus d'extravasation. L'IL-12 permet la génération de lyTh1 et l'expansion de lyT CD8+ cytotoxiques, c'est donc une cytokine importante dans la promotion des cellules autoréactives. Un sous type de DC appelé cellules dendritiques plasmacytoïdes de type 2 (pDC2, CD123^{low}CD86^{hi}TLR2^{hi}), favorise la formation de lyT pathogènes associés à la SEP *via* la production d'IL-6 et de TNF α , des inducteurs de lyTh17 (Attfield *et al.* 2022).

1.4.2.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes jouent un rôle essentiel dans la pathogenèse de la SEP (Kunkl *et al.* 2020 ; Schafflick *et al.* 2020). La susceptibilité accrue de développer une SEP selon l'expression du HLA serait due à une présentation favorisée d'autoantigènes spécifiques du SNC aux lymphocytes T. On peut détecter des lyT autoréactifs dans les lésions du SNC dès les premiers stades de la pathologie chez les patients en particulier dans les lésions actives qui présentent un phénotype mémoire (Attfield *et al.* 2022). Les lyT effecteurs pro-inflammatoires, les plus largement impliqués dans la SEP sont les lyT CD4+ auxiliaires de type 1 (T *helper*, Th1) et 17 (T *helper* 17, Th17) et ainsi que les lyT CD8+. Ces derniers agissent par contact cellulaire (reconnaissance d'antigènes du soi à la surface de la gaine de myéline, présentés par le CMH de classe I (CMH-I)) et provoquent une perte de myéline par la destruction directe des oligodendrocytes (cellules productrices de la myéline), *via* la production de cytokines (Ligand de Fas, IFN γ et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF α) et de facteurs cytotoxiques comme les perforines et les granzymes (granzyme A (GzmA) et granzyme B (GzmB)) et en sécrétant à la fois de l'IFN γ et de l'IL-17 (Huber *et al.* 2013). Plusieurs données soutiennent l'impact de la fonction cytotoxique des lyT CD8+ dans les dommages axonaux : des analyses histologiques d'échantillons du SNC issus de patients post-mortems ont montré une corrélation entre les lésions et la présence de lyT CD8 (Melzer *et al.*, 2009) et des niveaux accrus de granzymes (GzmA et GzmB) ont été trouvés dans le LCR de patients en poussées actives de la maladie par rapport à ceux en rémission (Malmeström *et al.* 2008). En parallèle, des études ont montré qu'après une infection à l'EBV, les lyB ou les monocytes infectés présentent des peptides dérivés de l'EBV et activent les lyT CD8+ directement dans les lésions de la SEP. Ces derniers sont alors capables d'exprimer l'IFN γ et la granzyme B (Attfield *et al.* 2022).

Les lymphocytes Th1 et Th17 produisent respectivement de l'IFN γ et de l'interleukine 17 (IL-17) et orchestrent une réponse inflammatoire exacerbée contre la gaine de myéline en recrutant et activant d'autres cellules immunitaires. L'administration d'IFN γ à des patients atteints de SEP a aggravé leur maladie soutenant l'effet pathogénique de cette cytokine (Panitch *et al.* 1987). Au contraire, l'administration d'anticorps anti-IL17 à des patients atteints de SEP a réduit la formation de lésions, montrant un rôle pathogénique de l'IL-17 (Havrdová *et al.* 2016). Ces lymphocytes auto-immuns Th1 et Th17, une fois au niveau du SNC, sont réactivés par les APC et induisent *via* leur production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines : le recrutement d'autres cellules telles que les lyT, les lyB, les macrophages et les neutrophiles ; l'activation et la maturation de la microglie résidente du SNC (Murphy 2010), des monocytes infiltrants et des astrocytes. Les Th17 peuvent également affaiblir l'intégrité de la BHE, notamment *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et favorisent ainsi la neuro-inflammation (Tahmasebinia *et al.* 2017). Il a été observé des lyT qualifiés de

pathogéniques les lymphocytes Th17 de type Th1 (appelés Th17.1) exprimant à la fois l'IL-17 et l'IFN γ et les facteurs de transcriptions liés ROR γ t et T-bet dans le tissu cérébral de patients atteints de SEP et également dans l'EAE (Fletcher *et al.* 2010 ; Kebir *et al.* 2009). Dans le modèle EAE, on observe aussi la génération de lymphocytes Th17.1, producteurs doubles d'IFN- γ et d'IL-17. Ce mécanisme impliquerait une expression élevée d'IL-7 (Arbelaez *et al.* 2015 ; Verstappen *et al.* 2018). Bien que les mécanismes associés à cette plasticité phénotypique n'aient pas encore été clarifiés chez l'Homme (Verstappen *et al.* 2018), il a été démontré que les Th17.1 sont capables de traverser la BHE humaine. Une accumulation de ces cellules dans le SNC des souris a également été observée tout au long de la phase effectrice (qui concerne la migration des cellules immunitaires vers le SNC) de l'EAE (Kebir *et al.* 2009). De ce fait, les lymphocytes Th17.1 ont été étroitement associés à la SEP avec un espoir croissant pour de nouvelles thérapies ciblées (van Langelaar *et al.* 2018).

1.4.2.2 Les lymphocytes B

Sur la base des résultats des thérapies sélectives ciblant les lymphocytes B (telles que les anticorps anti-CD20), leur implication dans le développement des rechutes de SEP a ainsi émergé (*cf.* 1.6 Les traitements). On observe une production accrue d'anticorps (Ac), dans le SNC des patients : augmentation des taux d'immunoglobulines dans le LCR, les méninges et le parenchyme (Attfield *et al.* 2022). Cependant, la réduction du taux de rechutes avec la thérapie anti-CD20 n'entraîne pas ou peu de changement du profil d'immunoglobulines dans le LCR des patients (Monson *et al.* 2005), suggérant un rôle des lyB indépendant des Ac durant les poussées de SEP. Cela est probablement lié aux autres rôles des lyB : dans la présentation de l'antigène et la régulation des lyT *via* les processus de coopération cellulaire, permettant d'attirer et d'activer les lyT et les cellules myéloïdes dans le SNC (Li *et al.* 2018). En effet, les lyB des patients produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (dont IL-6, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), TNF et lymphotoxine- α (LT α)) et sont déficients en cytokines régulatrices comme l'IL-10. Ce profil anormal de cytokines des lyB des patients peut participer aux réponses Th1 et Th17 aberrantes notamment *via* le TNF α et l'IL-6 et peut induire des réponses myéloïdes pro-inflammatoires (principalement *via* le GM-CSF). Tout cela pourrait contribuer à la cascade immunitaire impliquée dans les rechutes de la maladie (Bar-Or *et al.* 2010 ; Li *et al.* 2015 ; Barr *et al.* 2012 ; Li *et al.* 2017). Des lyB avec un phénotype neurotoxique ont été observés chez des patients atteints de SEP : ils sécrètent *in vitro* des facteurs solubles toxiques pour les oligodendrocytes (Lisak *et al.* 2012) et les neurones (Lisak *et al.* 2017). Ces facteurs toxiques ne sont pas complètement identifiés mais la cytotoxicité est indépendante des immunoglobulines (Ig) et de plusieurs cytokines (telles que le TNF α , l'IL6), non médiée par le complément et implique l'apoptose.

1.4.2.3 Les cellules Myéloïdes

L'activation aberrante des lyT dans la SEP nécessite la présentation de l'antigène par des CPA telles que les lyB et les cellules myéloïdes à la périphérie (macrophages/monocytes, cellules dendritiques) et dans le SNC (la microglie) (Jelcic *et al.* 2018 ; Filippi *et al.* 2018). En effet, les cellules myéloïdes circulantes chez les patients atteints de SEP ont un profil pro-inflammatoire avec une expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-12, l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-1 β , impliqués dans la différenciation des Th1 et Th17 (Attfield *et al.* 2022). Les monocytes classiquement définis par leurs marqueurs CD14 et/ou CD16, peuvent soit patrouiller dans la circulation et phagocyter les débris cellulaires, soit migrer par chimiotaxie dans les tissus dans lesquels ils se différencient davantage en macrophages ou en cellules dendritiques dérivés de monocytes, pour présenter l'antigène aux lymphocytes T infiltrants et produire des cytokines polarisantes. Chez les patients atteints de SEP, le nombre de monocytes durant la phase précoce de la maladie est associé à la gravité clinique (Akaishi *et al.* 2018 ; Kouwenhoven *et al.* 2001). Un certain type de monocytes (producteur d'IL-12) est aussi corrélé aux lésions actives (Makhlouf *et al.* 2001). Une étude randomisée pilote a montré que l'utilisation d'un antioxydant naturel (l'acide lipoïque) qui permettait une diminution de l'activation et de l'activité phagocytaire des monocytes a permis de réduire l'atrophie cérébrale (Spain *et al.* 2017). Après la microglie résidente dans le SNC, les macrophages sont les types de cellules, les plus abondants dans les lésions inflammatoires aiguës de la SEP. Ils y exercent de multiples fonctions selon leurs polarisations. Grâce au modèle EAE, il a été montré que les macrophages adaptaient leurs phénotypes selon le compartiment du SNC qu'ils pénètrent, en modifiant différents facteurs : la production d'adénosine triphosphate (ATP), leur potentiel phagocytaire et leur capacité à produire des espèces réactives (Locatelli *et al.* 2018).

Il y a d'autres cellules du SI qui pourraient contribuer à la physiopathologie de la SEP telle que les lyT non conventionnels (lyT $\gamma\delta$, *mucosal associated invariant T cells* (MAIT)), les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cells*, ILC), les cellules *natural killers* (NK), bien que leurs rôles soient encore mal définis.

1.4.2.4 Les cellules gliales : la microglie et les astrocytes

La microglie

Les cellules microgliales sont les macrophages des tissus du SNC, résidant en permanence dans le parenchyme, où ils sont capables de s'autoreconstituer (Huang *et al.* 2018). L'activation de la microglie en situation pathologique n'est pas uniforme. Dans la SEP-RR, la microglie développe une morphologie amiboïde et produit des molécules pro-inflammatoires (Murphy *et al.* 2010) : on dit alors qu'elle

adopte un phénotype de type pro-inflammatoire (**Figure 7B**) en réponse à l'IFN- γ et/ou à l'interleukine IL-17, issues des lymphocytes Th1 et Th17 autoréactifs présents à leur voisinage (Murphy et al. 2010). Le développement d'outils a permis une meilleure distinction entre la microglie (cellules résidentes) et les cellules myéloïdes infiltrantes du SNC, montrant des phénotypes et des rôles non redondants dans des conditions pathologiques (Goldmann *et al.* 2013 ; Yamasaki *et al.* 2014 ; Prinz *et al.* 2008 ; Shechter *et al.* 2009). La microglie sécrète de nombreuses cytokines pro-inflammatoires que l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-12 et le ligand de chimiokine CC (CCL) 2, le TNF- α , production de ROS et d'oxyde nitrique et exprime les CMH-I et CMH-II, *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (IBA1), des molécules co-stimulatrices (la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), B7-1 et B7-2), des récepteurs Fc (I–III) et des récepteurs du complément (CR1, CR2 et CR4). Dans certains cas, la microglie peut favoriser les processus de régénération tels que la remyélinisation par l'expression de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10, la phagocytose des débris et la réparation des tissus. Dans d'autres, la microglie peut jouer le rôle de CPA en présentant des antigènes et sécrétant des molécules pro-inflammatoires qui peuvent endommager la gaine de myéline et/ou les oligodendrocytes : ce qui conduit à l'activation des lyT au cours de la SEP. Cependant, elle ne semble pas être la cellule CPA dominante dans la pathogenèse de la SEP (Wolf *et al.* 2018). En effet, comme expliqué précédemment, les lyT sont principalement réactivés soit par les CPA résidentes périvasculaires, soit par les CPA infiltrantes. Les cellules microgliales sont considérées comme des orchestrateurs cruciaux de l'homéostasie tissulaire et de l'inflammation. En effet, la microglie en tant que phagocytes tissulaires, tente constamment d'éliminer les fortes quantités toujours croissantes de débris cellulaires et de myéline qui s'accumulent. Ces derniers peuvent en retour agir comme des signaux de danger innés, contribuant à l'activation de la microglie elle-même (Fu *et al.* 2014). Trois sous-types de microglie associés à la SEP ont été identifiés dans le cerveau humain (Hu-C3, Hu-C8 et Hu-C2) (Pettas et al. 2022). Ces trois groupes présentent une expression accrue du marqueur d'activation des cellules myéloïdes, l'apolipoprotéine E (ApoE) et du facteur de transcription *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B* (MAFB), indiquant leur statut activé (Tozaki-Saitoh *et al.* 2019). Un de ces groupes (Hu-C3) exprime plus fortement les molécules qui peuvent interagir avec d'autres cellules immunitaires *via* le CMH-II, telles que CD74, HLA-DRA, HLA-DRB1 et HLA-DPB1, suggérant un rôle immuno-régulateur de ce sous-groupe alors que la microglie Hu-C8 est associée à la démyélinisation. La proportion de ces trois groupes varie d'un individu à l'autre (Pettas *et al.* 2022).

Les astrocytes

Les astrocytes jouent un rôle de soutien avec la production de facteurs trophiques permettant de maintenir la survie des neurones et de réguler l'activité des oligodendrocytes. Mais, ils sont aussi

capables de jouer un rôle inflammatoire en sécrétant des cytokines anti- ou pro-inflammatoires en fonction du contexte. La microglie (Liddelow *et al.* 2017) comme les lyT (Wheeler *et al.* 2020), produit de nombreuses molécules influençant l'état d'activation des astrocytes résidents dans le SNC. Dans la SEP, les astrocytes sont activés (on parle d'astrogliose) par l'environnement inflammatoire du SNC. Ils expriment alors la protéine d'acides fibrillaires gliales (GFAP). Cette astrogliose aggrave la pathologie selon plusieurs mécanismes comme le recrutement de monocytes, l'activation accentuée de la microglie (par effet autocrine), la production de médiateurs neurotoxiques et inflammatoires. De plus, les astrocytes activés produisent moins de facteurs neurotrophiques (qui soutiennent l'intégrité neuronale) et favorisent ainsi la neurodégénérescence (Sanmarco *et al.* 2021). Comme pour les autres cellules immunitaires, le rôle de la microglie résidente dans le SNC et leur interaction avec les astrocytes durant la pathogenèse de la SEP, dépend probablement du contexte environnemental et des effets des différents traitements, expliquant les divergences apparentes dans les résultats de différentes études.

1.4.2.5 Les processus régulateurs

La régulation du système immunitaire

En parallèle des cellules impliquées dans cette amplification de la réponse contre la gaine de myéline, des processus immunomodulateurs et régulateurs sont mis en place pour contrer cette auto-immunité, notamment *via* la présence de lyT régulateurs (Tregs). Différents types de Tregs existent, issus directement du thymus appelé Tregs naturels (nTregs) ou induit en périphérie appelé iTregs qui sont divisés en différentes sous-populations principalement distingués par leurs profils d'expressions de cytokines anti-inflammatoires, dont notamment les Tregs de type 1 (TR1, producteurs d'IL-10) et les Tregs de type 3 (TR3, producteurs de TGF β). Une des hypothèses quant à la génération de lyT autoréactifs est un défaut dans la tolérance périphérique assurée par les Tregs soit car le nombre de Tregs est trop bas, soit les Tregs présentent un déficit fonctionnel (capacité de suppression *in vitro* diminué). Chez les patients, la fréquence de Treg semble être la même par rapport aux témoins, mais plusieurs anomalies ont été observées, dont une diminution de l'expression de la protéine FOXP3 et/ou une fonction suppressive altérée des lymphocytes Treg (Venken *et al.* 2008 ; Viglietta *et al.* 2004 ; Frisullo *et al.* 2009), ainsi qu'une polarisation vers un état de type Th1 chez les patients non traités avec l'acquisition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une activité suppressive réduite (Dominguez-Villar *et al.* 2011). La fonction suppressive des Tregs peut être restaurée *via* la stimulation du *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) : cela serait une bonne stratégie thérapeutique (Lucca *et al.* 2019). Les lymphocytes TR1 réduisent la gravité de la maladie EAE (Mascanfroni *et al.* 2015). De même, chez les patients, l'augmentation de l'IL-10 produite par les

lymphocytes TR1, est également associée à une activité réduite de la maladie (Astier and Hafler. 2007). Cependant, selon les études, le rôle des Tregs dans la SEP diffère, reflétant probablement leur plasticité phénotypique (polarisation en faveur d'autres Th) et un rôle variable selon le contexte de la pathologie (Verma *et al.* 2021).

Bien que les Tregs soient les cellules régulatrices immunitaires les plus importantes, d'autres cellules immunitaires jouent également un rôle dans la tentative de contrôle du SI. On peut notamment parler des Breg, ce sont des lymphocytes B produisant la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Les Breg sont présents dans les lésions de la SEP (Machado-Santos *et al.* 2018).

Les processus de neurodégénération versus neurorégénération

Comme dit précédemment, il y a une réponse inflammatoire forte et chronique contre la gaine de myéline entraînant la mort des oligodendrocytes et des processus de démyélinisation, qui conduisent à une altération de la conduction saltatoire et donc de l'influx nerveux. La perte de la gaine de myéline entraîne au niveau de l'axone qui est alors mis à nu une augmentation des canaux sodiques : le taux augmenté de sodium est d'ailleurs visible sur des images IRM de cerveaux de patients atteints de SEP. Cette augmentation des canaux sodiques issue de la démyélinisation, favorise une cascade d'événements nocifs à l'homéostasie axonale tels que : l'influx calcique, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS) qui conduisent à l'accumulation de mutations néfastes de l'ADN mitochondrial, un défaut de la mitochondrie (présence de lésions), un déficit énergétique favorisant un stress oxydatif et métabolique, le mauvais repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE) et une perte de l'activité neuronale. Tout cela entraîne une atrophie axonale, puis une mort neuronale : cette perte de contacts synaptiques avec des neurones voisins peut également avoir des effets négatifs sur ces derniers eux-mêmes. Cependant le développement de lésions corticales plus distales est moins bien compris mais pourrait s'expliquer par des facteurs solubles produits par les cellules immunitaires qui diffusent dans le parenchyme cérébral, permettant la migration et l'activation de la microglie entraînant des lésions tissulaires et la neurodégénérescence. Ces facteurs solubles ne sont pas connus, mais actuellement les meilleurs candidats sont des cytokines pro-inflammatoires L'IFN γ , le TNF, l'IL-17 et le GM-CSF, bien que des composants de la coagulation et de la cascade du complément pourraient aussi jouer un rôle important (Wagner *et al.* 2019).

Le SNC présente tout de même une capacité à se régénérer *via* la présence d'oligodendrocytes progéniteurs qui peuvent se différencier en oligodendrocytes matures et ainsi remyéliniser spontanément les axones (Chari 2007). Cela permet de ralentir les processus de démyélinisation. Cependant, la réponse auto-immune forte persiste, notamment due à la fuite d'antigènes du SNC vers la périphérie. En effet, la mort des oligodendrocytes entraîne la génération de débris cellulaires et la

libération d'antigènes oligodendrocytaires. Ces déchets vont être évacués du SNC, comme expliqué précédemment *via* le système de flux entre le liquide interstitiel et le LCR. Ces antigènes vont donc se retrouver à la périphérie et alimenter davantage la réponse auto-immune en permettant son maintien à long-terme : cette fuite antigénique sert ainsi de rétrocontrôle positif. La chronicité de l'inflammation entraîne : une altération des processus d'immunorégulation liés aux lymphocytes Tregs (et Bregs), une dégradation progressive de la BHE et une fragilisation des processus de réparation orchestrés par les oligodendrocytes progéniteurs. Cela est illustré par une remyélinisation défectueuse avec la présence de gaines de myéline incomplètes et/ou moins épaisses. *In fine*, à un moment donné, le défaut de neuroprotection/neurorégénération donne lieu à une atrophie axonale et une mort neuronale irréversible (**Figure 9 stade tardif**). On a donc en parallèle des cellules impliquées dans cette amplification de la réponse immunitaire contre la gaine de myéline et des processus immunomodulateurs et régulateurs mis en place pour contrer cette auto-immunité et initier une réparation dans les temps précoces de la pathologie. Potentiellement, cela pourrait expliquer la forme de SEP récurrente-rémittente, où les périodes de rémission correspondraient aux actions combinées des Tregs et des processus de neuro-régénération associés aux activités des oligodendrocytes progéniteurs. Au contraire, les périodes de rechute seraient associées à un défaut de leur activité. La multiplicité des lésions correspondant à des zones de démyélinisation riches en cellules immunitaires, oligodendrocytes et neurones mourant, entraîne la diminution du volume cérébral.

Dans les stades avancés de la maladie, la perte neuronale exacerbe le handicap physique et l'impact du système immunitaire, bien que toujours présent, est alors bien plus faible (Attfield *et al.* 2022). De plus, la résilience neuronale (capacité des neurones à encaisser les chocs) influence encore plus l'évolution de la SEP (Woo *et al.* 2021). Des études neuropathologiques utilisant des IRM de patients atteints de SEP à différents stades de la maladie montrent que les nouvelles lésions inflammatoires focales deviennent moins fréquentes avec l'âge et la durée de la maladie. L'infiltration des cellules immunitaires de la périphérie vers le SNC est particulièrement importante dans les formes précoces de SEP (SCI et SEP-RR) et fait l'objet principal des thérapies actuellement disponibles pour la SEP (*cf.* 1.6 Les traitements). Ils permettent la diminution des rechutes, mais ils n'arrêtent pas la progression de la pathologie, ni les dommages neuronaux qui continuent de s'accumuler.

L'atrophie cérébrale permet de mesurer la neurodégénérescence dans la SEP. Cette atrophie suit une évolution temporo-spatiale pathologique (Eshaghi *et al.* 2018) semblable à d'autres troubles neurodégénératifs primaires comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou de Huntington. Il a alors été supposé que des mécanismes pathologiques semblables à ceux observés dans ces pathologies neurodégénératives, pourraient aussi contribuer à la disparition des neurones

observée dans la SEP. En effet, il a été également observé dans la SEP le dépôt et/ou la propagation d'agrégats de protéines toxiques telles que la protéine amyloïde- β , tau (dans la maladie d'Alzheimer), l' α -synucléine (dans la maladie de Parkinson) ou la huntingtine (pour la maladie de Huntington) (Peng *et al.* 2020). Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'inflammation dans la SEP perturbe l'homéostasie des neurones, en entraînant la formation d'agrégats de protéines *bassoon* présynaptiques et contribuant ainsi à la lésion neuronale (Schattling *et al.* 2019). Ces agrégats de protéines *bassoon* induits par l'inflammation chronique se propageraient alors de neurones en neurones indépendamment de l'inflammation, cela peut expliquer en partie la progression de la neurodégénérescence chez des patients atteints de la SEP sous immunothérapie (Ontaneda *et al.* 2017).

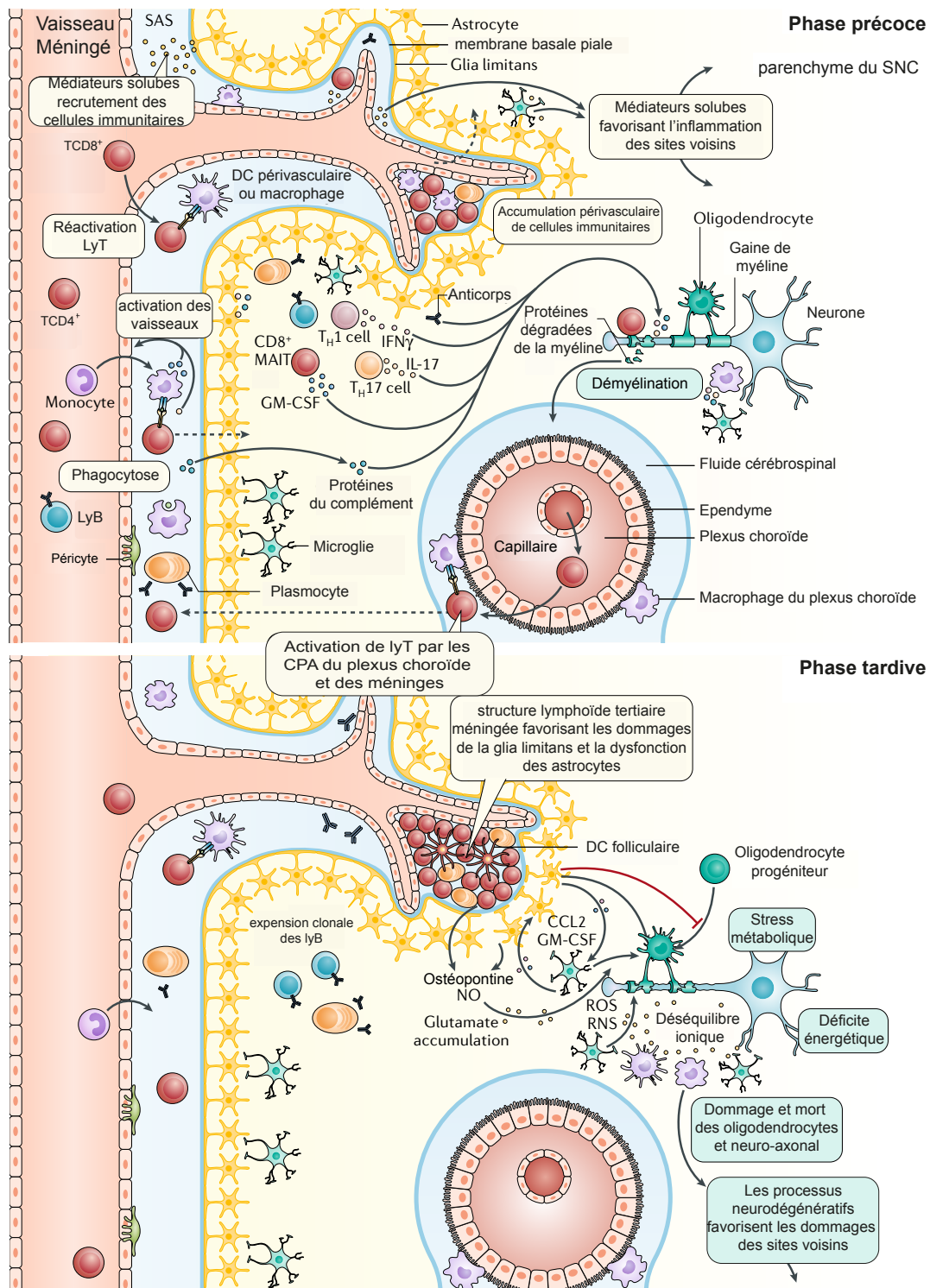


Figure 9 : Physiopathologie de la sclérose en plaques durant les phases précoce et tardive. Dans la sclérose en plaques (SEP), les cellules immunitaires pénètrent dans le système nerveux central (SNC) par les vaisseaux sanguins de la barrière du plexus choroïdes, barrière leptoméningée au niveau de l'espace sous-arachnoïdien (SAS) et hémato-encéphalique (BHE) (flèches en pointillés). Durant les poussées de SEP, qui sont plus importantes dans les phases précoces de la maladie (panneau du haut), les mécanismes sous-jacents impliquent l'infiltration de cellules du SI inné et adaptatif telles que les lyT CD4⁺ et CD8⁺, les lyB et les cellules myéloïdes, avec une distribution périvasculaire autour des veinules post-capillaires de la BHE. Ces dernières peuvent s'accumuler dans les espaces périvasculaires et ensuite pénétrer dans le parenchyme du système nerveux central (suite à la perméabilité de la BHE). Les cellules

immunitaires, ainsi que la microglie activée et les astrocytes, contribuent aux lésions des oligodendrocytes entraînant la démyélinisation, les lésions axonales et neuronales par le biais de mécanismes à médiation cellulaire et humorale (sécrétion de facteurs solubles inflammatoires et neurotoxiques). Aux stades tardifs de la maladie (panneau du bas), l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC est diminuée, mais le nombre de cellules accumulées dans l'espace périvasculaire est plus important. L'inflammation et la neurodégénérescence chroniques intrinsèques au SNC continuent. Les structures méningées de type lymphoïde tertiaire, qui ont été spécifiquement documentées dans la maladie progressive secondaire, qui peuvent contribuer à l'inflammation chronique à un stade avancé chez les patients atteints de cette forme de SEP notamment en réactivant les cellules résidentes dans le SNC (par exemple, la microglie). L'action des cellules innées résidant dans le SNC peut contribuer à l'inflammation chronique, quel que soit le sous-type précis de la maladie. Stimulés par la microglie, les astrocytes peuvent produire le CC-chimiokine ligand 2 (CCL2) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), conduisant à un recrutement et à une activation encore plus poussée de la microglie. De plus, les astrocytes peuvent empêcher la remyélinisation aux sites de lésions neuro-axonales, en empêchant les cellules progénitrices de se développer en ODC matures. Les mécanismes contribuant aux lésions tissulaires et la neurodégénérescence sont dus à un stress oxydatif aigu ou chronique, favorisé par l'activation innée et adaptative des cellules immunitaires, un dysfonctionnement mitochondrial, l'accumulation extracellulaire de fer libre, la perte du support trophique de la myéline, l'hypoxie, l'altération de l'homéostasie du glutamate et l'environnement pro-inflammatoire, avec une implication de facteurs cytotoxiques et de l'activation du complément. CPA, cellule présentatrice de l'antigène ; DC, cellule dendritique ; MAIT, T invariant associé aux muqueuses ; NO, oxyde nitrique ; RNS, espèces azotées réactives ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; Th1, T helper 1 ; Th17, T helper 17. Adapté de Dendrou et al. 2015 et Fillipi et al. 2018.

1.5 Les modèles animaux

1.5.1 Généralités

Le développement de modèles animaux de pathologies humaines a principalement 2 grandes fonctions : (1) mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et d'identifier des mécanismes d'actions et (2) tester de nouvelles thérapies ou d'améliorer des thérapies déjà existantes (par exemple définir la voie ou la fréquence d'administration, diminuer les effets secondaires). La première description d'un modèle animal pour la SEP date de 1933 (Rivers *et al.* 1933). A cette époque, la compréhension de la SEP restait très limitée et les premiers modèles de SEP ont été développés par hasard, puis au cours du temps, ils se sont améliorés et leur nombre s'est diversifié (Ferluan 2009). Mais, comme tous les modèles animaux, ils présentent des limites. Les processus physiopathologiques de la SEP sont multiples et hétérogènes, entraînant une hétérogénéité importante chez les patients : aucun modèle ne permet d'étudier la SEP dans toute sa globalité. Cependant, comme il existe plusieurs modèles expérimentaux, il devient alors possible, dans une certaine mesure, en les combinant de refléter l'hétérogénéité de la SEP. Par ailleurs, les caractéristiques histopathologiques pourront être étudiées et complétées à l'aide de tissus issus de patients atteints de SEP. De nombreux modèles existent selon l'utilisation de différents animaux (rongeurs, primates non-humains, zebra-fish...) et peuvent être classés en 3 grandes catégories : les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), les modèles de démyélinisation induites par les virus (virus de l'hépatite murine

(MHV), virus de Theiler) et/ou par une toxine (le bromure d'éthidium (EtBr), la cuprizone, la lysophosphatidylcholine). Je vais me concentrer plus particulièrement sur le modèle de démyélinisation induit par le virus de Theiler, le modèle induit par un virus, le plus utilisé et du fait, des récentes données sur l'impact de l'EBV dans le développement de la pathologie semble pertinent, ainsi que sur les modèles que j'ai utilisés lors de ma thèse : les modèles d'EAE et le modèle de démyélinisation induite par la toxine de cuprizone.

1.5.2 *Le modèle de Theiler*

Le modèle de Theiler (TMEV-IDD) est induit par un virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV), un virus à ARN monocaténaire non enveloppé de la famille des Picornaviridae. Identifié par Theiler en 1934 (Theiler 1934), il est capable de se loger dans le SNC induisant des paralysies caractéristiques de celles observées dans l'EAE. C'est le modèle d'infection virale neurotrope, le plus couramment utilisé dans l'étude de la SEP. Il permet une manifestation clinique proche de ce qui est observé dans la SEP progressive humaine. La gravité est dépendante de la souche virale et de la souche murine utilisées : par exemple, les souches virales GVDII et FA sont très agressives, tandis que les souches DA et BeAn le sont moins. Les souches agressives provoquent une neuropathologie extrêmement sévère, entraînant une mort rapide (Zoecklein et al. 2003). Les souches de souris sont divisées en souches hautement sensibles (SJL, DBA/1, DBA/2), intermédiaires (C3H et CBA), et résistantes (BALB/c, C57BL/6, C57BL/10 et 129/J) (Dal Canto et al. 1996). Le modèle TMEV-IDD, le plus largement utilisé correspond à une infection intracérébrale de la souche BeAn chez des souris SJL. Ce modèle se caractérise par une démyélinisation de la moelle épinière et par des lésions axonales (McGavern *et al.* 2000). La réponse inflammatoire est médiée par les lyT activés, le recrutement de macrophages et l'astroglie, et entraîne la destruction des tissus nerveux qui se manifeste par des handicaps moteurs (Pirko *et al.* 2009).

1.5.3 *L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)*

Le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle le plus utilisé dans l'étude de la SEP. L'implication du système immunitaire dans la SEP a d'ailleurs pu être démontrée grâce à ce modèle. Il a ainsi permis le développement de nombreuses thérapies notamment axées sur la modulation de la réponse T dans le SNC telles que par exemple le Fingolimod (modulateur des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate) ou le Natalizumab (anticorps monoclonal contre l'intégrine $\alpha 4\beta 1$). L'EAE se caractérise par deux phases : la phase d'immunisation et la phase effectrice. On distingue deux modes d'induction : l'EAE par immunisation active et l'EAE par immunisation passive. Sachant que le modèle peut s'induire dans plusieurs espèces animales (rongeurs, cochons, singes rhésus négatifs...), je vais me concentrer ici sur les modèles murins qui sont les plus utilisés.

1.5.3.1 L'EAE induite par immunisation active

La phase d'immunisation se réalise avec un antigène du SNC dans une émulsion contenant un adjuvant, majoritairement de l'adjuvant complet de Freund (*Freund's Complete Adjuvant*, CFA). Historiquement, l'immunisation se faisait *via* l'injection de tissus cérébraux bruts et au cours du temps, un raffinement progressif de la complexité du matériel antigénique injecté a été réalisé. Aujourd'hui, des petits peptides encéphalitogènes sont injectés tels que de peptides issues de la protéine basique de myéline (*myelin basic protein*, MBP) (MBP₁₋₃₇, MBP₁₋₁₁), la glycoprotéine oligodendrocyte de myéline (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG) (MOG₃₅₋₅₅) et la lipophilin (*myelin proteolipid protein*, PLP) (PLP₁₃₉₋₁₅₁), rendant ainsi les modèles d'EAE plus reproductibles, tout en reflétant différentes caractéristiques essentielles du développement de la SEP (Mix *et al.* 2010). De plus, selon le choix du peptide utilisé, de la souche de souris, de son âge et de son sexe, on peut observer une évolution différente de la maladie permettant de retranscrire l'hétérogénéité de la physiopathologie de la SEP chez l'Homme.

Le plus souvent, les peptides sont émulsionnés avec du CFA et injectés en sous-cutané. Cela est accompagné d'une injection intraveineuse ou intrapéritonéale de toxine pertussique (TP) le jour de l'immunisation et 48 heures après (Stromnes et Goverman 2006). Le CFA est une préparation adjuvante de mycobactéries tuées, le plus souvent de *Mycobacterium tuberculosis*, dans une émulsion d'eau et d'huile. Le CFA est utilisé la première fois en 1947 par Kabat *et al* pour induire de manière fiable l'EAE chez les singes rhésus négatifs, puis chez la souris où des résultats similaires ont été observés. Par la suite, le vaccin *Bordetella pertussis* (contenant la toxine pertussique) a été utilisé en complément dans le but d'induire l'EAE de manière plus fiable. Des études ultérieures ont d'ailleurs identifié la toxine pertussique comme le composant responsable de l'adjuvantité. Le CFA a des rôles multiples dans l'EAE. Une de ces fonctions est d'assurer la persistance d'un antigène aux sites concernés. Il permet également une amélioration de la fonction des CPA, y compris une expression accrue du CMH, des molécules co-stimulatrices et des cytokines telles que l'IL-12 qui favorise la réponse immunitaire cellulaire Th1, qui active les macrophages et qui favorise le recrutement des lymphocytes T mémoires. Les mycobactéries dans le CFA semblent permettre la perméabilité de la BHE. Cette capacité du CFA à induire l'EAE est due aux composants mycobactériens. En effet, l'immunisation avec l'antigène dans l'IFA (un adjuvant incomplet de Freund, émulsion sans *Mycobacterium*) ne parvient pas à induire l'EAE et semble être tolérogène *via* le développement d'une réponse Th2 (Namer *et al.* 1994). Le principal inconvénient du CFA est qu'il peut provoquer des granulomes et des lésions au niveau du site d'inoculation. Les mécanismes permettant l'induction de l'EAE par la toxine pertussique sont complexes et ne sont pas encore totalement compris. Certaines études montrent qu'elle faciliterait l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC, et privilégierait la prolifération des lymphocytes T et leur

production de cytokines, la rupture de la tolérance et la génération de lyT autoréactifs (Waldner *et al.* 2000).

Le modèle EAE comme dit précédemment, a permis de décortiquer la physiopathologie de la SEP. On retrouve donc après immunisation des processus semblables à ceux expliqués précédemment. En effet, la phase d'immunisation permet la génération de lyT autoréactifs (Th1 et Th17) au niveau des organes lymphoïdes secondaires. La phase effectrice de l'EAE correspond à leur migration dans le SNC, entraînant une dégradation progressive de la myéline (*cf.* 1.4.2 Physiopathologie de la SEP). Généralement, le cerveau antérieur, le cortex, le corps calleux et les structures sous corticales sont épargnés dans l'EAE. On observe chez la souris en majorité une dégénérescence axonale étendue et très peu de démyélinisation ; ce qui est différent de ce que l'on observe chez les patients atteints de SEP. L'EAE se mesure ensuite *via* le degré de paralysie commençant par une paralysie de la queue, puis des membres postérieurs et possiblement antérieurs. Ainsi, un score de paralysie peut être mis en place quotidiennement pour rendre compte de la sévérité de la maladie (**Tableau 1**).

Score	Signe clinique
0	Souris normale, pas de signe clinique
1	Perte de la tonicité de la queue
2	Perte de la tonicité de la queue et paralysie partielle des membres inférieurs
3	Paralysie complète des membres inférieurs
4	Paralysie complète des membres inférieurs et faiblesse des membres supérieurs
5	Moribond/ Tétraplégie

Tableau 1 : score EAE associés aux signes cliniques

Différents modèles d'EAE peuvent être induits en utilisant différents composés (peptides, adjuvants, TP) et selon la souche de souris utilisée : les modèles d'EAE aiguë, d'EAE chronique mimant les formes les plus sévères de la SEP et d'EAE récurrente-rémittente sont les plus courants.

L'EAE aiguë peut être induite chez des souris SJL immunisées avec du *spinal cord homogenate* (SCH) et permet une période de récurrence monophasique c'est-à-dire qu'on observe un seul pic de récurrence (environ 20 jours après l'induction) suivi d'une rémission complète (une 30aine de jours après immunisation). Ce n'est pas le modèle, le plus robuste mais il est très rapide (3-4 semaines) et de ce fait, permet de tester de nombreuses molécules à potentiel thérapeutique rapidement et de sélectionner les plus prometteuses qui pourront ensuite être testées dans d'autres modèles. Pour induire une EAE dite chronique, des souris C57BL/6 sont immunisées par une injection sous-cutanée

avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ de la glycoprotéine de la myéline oligodendrocytaire et du CFA, ce qui entraîne une maladie chronique. L'apparition de la maladie est similaire à celle de l'EAE aigue (pic une vingtaine de jours après induction) mais ici les souris ne récupèrent que légèrement et le score clinique atteint un plateau qui se maintient au moins jusqu'à 40 jours après immunisation. Ce modèle est le plus fréquemment utilisé car il existe de nombreuses souris transgéniques de fond C57BL/6. Pour l'induction de EAE dite récurrente-rémittente, des souris Lambert SJL/J sont immunisées avec le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁. Cela entraîne une maladie avec une évolution récurrente-rémittente (EAE-RR) avec une alternance de périodes de poussées (d'environ 3 à 5 jours) et des périodes de rémission comme la forme SEP-RR chez les patients.

1.5.3.2 EAE induite par immunisation passive

Une autre façon d'induire l'EAE est réalisée avec le transfert adoptif de lyT autoréactifs. Des souris donneuses syngéniques ont été préalablement immunisées par les peptides de la myéline. Les organes lymphoïdes secondaires (rate et/ou ganglions lymphatiques drainant) ont été collectés afin de réaliser une réactivation des cellules *in vitro* avec les mêmes antigènes de la myéline ayant servi lors de l'immunisation. Les souris receveuses syngéniques sont injectées avec soit toutes les cellules activées, soit une sous-population spécifique telle que les lymphocytes Th1 ou Th17. L'EAE passive s'avère précieuse pour évaluer le rôle central des lyT durant la maladie et pour étudier la phase effectrice (correspondant à la migration des cellules autoréactives vers le SNC) de la maladie en l'absence d'immunisation. L'EAE se développe plus rapidement et de manière plus homogène, avec un début de la maladie 6 à 10 jours après injection et un pic 12-15 jours après injection puis une rémission complète, ce qui a une pertinence discutable pour la SEP (Wekerle *et al.* 1994). Il est ici possible de manipuler les lymphocytes T *in vitro* avec une variété de molécules inflammatoires avant transfert, ce qui permet d'étudier l'influence de différents sous-types de lyT impliqués dans la maladie. L'inconvénient est que les lyT spécifiques de l'antigène de la myéline transférés aux animaux receveurs peuvent ne pas avoir la capacité encéphalitogène *in vivo*, ce qui signifie que le transfert adoptif de lyT peut être incapable d'induire la perte de myéline. De plus, c'est un modèle à court-terme, du fait de la mort par apoptose des cellules injectées, ce qui n'est pas représentatif de la pathologie.

1.5.4 Le modèle de démyélinisation induite par la toxine de la Cuprizone

C'est un modèle permettant d'étudier deux aspects de la SEP : les processus de démyélinisation et de remyélinisation en absence d'inflammation médiée par les lymphocytes T, avec comme avantage une très bonne reproductibilité et une localisation anatomique de ces processus bien définie. Le modèle *in vivo* de Cuprizone a été introduit dans les années 70 (Ludwin 1978). La Cuprizone (acide bis(cyclohexylidenehydrazide)oxalique ; CPZ) est un agent chélateur du cuivre connu pour être toxique, principalement pour les oligodendrocytes matures conduisant à la démyélinisation. Le

mécanisme d'action sur les oligodendrocytes matures n'est pas clairement défini, mais il semblerait que la CPZ induise le dysfonctionnement des enzymes mitochondriales et un stress oxydatif et métabolique des oligodendrocytes. L'apoptose des oligodendrocytes matures se produit 3 jours après introduction de la CPZ (généralement à 0,2% par voie orale). La démyélinisation est généralement évidente 3 semaines après le début de l'administration de la CPZ, accompagnée d'une microgliose importante, d'une astrogliose et d'un dommage axonal (Kipp *et al.* 2017). 5-6 semaines après, la démyélinisation est généralisée et aiguë, mais plus importante au niveau du corps calleux et des pédoncules cérébelleux. Au cas où l'ingestion de CPZ se prolonge au-delà de 5 semaines, on parle alors de démyélinisation chronique : la démyélinisation est alors observée dans le corps calleux, le cortex, l'hippocampe et le cervelet (**Figure 10**).

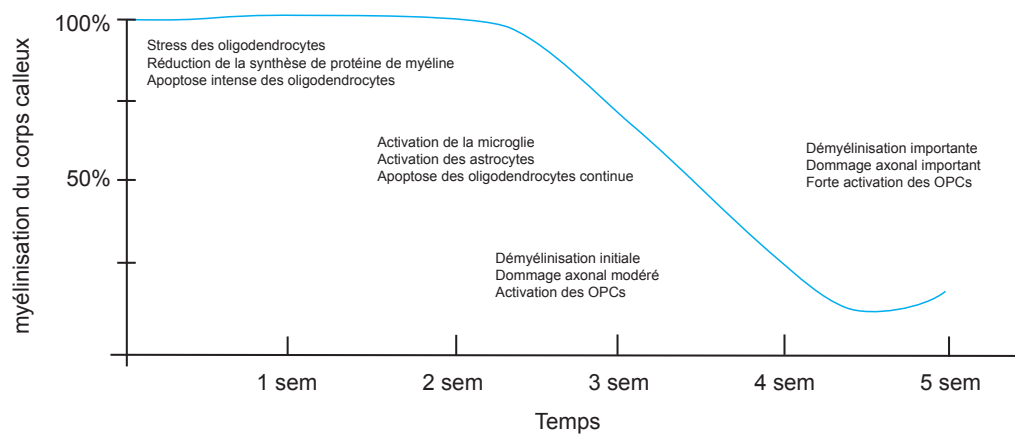


Figure 10 : Caractéristiques du modèle cuprizone. Schéma illustrant les caractéristiques pathologiques lors de la démyélinisation induite par la cuprizone. La ligne bleue illustre les niveaux de myélinisation au cours du temps. D'après Zhan *et al.* 2020

Après arrêt d'administration de la CPZ, les animaux présentent une remyélinisation spontanée dès 4 jours après arrêt de la cuprizone. Ce processus est dépendant des progéniteurs des oligodendrocytes qui peuvent se différencier en oligodendrocytes matures. En phase de démyélinisation chronique (plus de 5 semaines de CPZ), ce processus de remyélinisation endogène est grandement perturbé (Zhan *et al.* 2020). Comme pour les modèles d'EAE, la démyélinisation est dépendante de la souche, du sexe et de l'âge des souris utilisées. Par exemple, les souris SJL, Swiss et BALB/c présentent une démyélinisation, mais retardée ou incomplète par rapport aux souris C57BL/6. Le modèle CPZ est largement utilisé avec des souris C57BL/6, car il est hautement reproductible et le sexe est sans incidence, contrairement à la souche SJL où les femelles sont résistantes.

Le modèle Cuprizone est un outil élégant et simple qui permet d'étudier différents aspects de la pathologie de la SEP. Comme dans la SEP, on observe des lésions de la myéline et de l'axone d'origine inné, une activation fonctionnelle des voies de stress oxydatif et une préservation relative de la BHE.

Des résultats récents ont montré que le modèle Cuprizone, combiné à une induction active ou passive de l'EAE, serait un bon moyen pour étudier la pertinence des événements dégénératifs intrinsèques au cerveau, impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires périphériques (Rüther *et al.* 2017 ; Scheld *et al.* 2016). Une meilleure compréhension des facteurs régulant les différents aspects histopathologiques de l'intoxication à la Cuprizone pourrait ouvrir la voie au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de SEP.

1.6 Les traitements

À ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible, et sa prise en charge est difficile du fait de la nature hétérogène de la maladie. Néanmoins, il existe de nombreux traitements, notamment pour les formes SEP-RR, mais très peu pour les formes dites progressives (SEP-PS et SEP-PP) dont il est nécessaire d'améliorer la prise en charge. Cela demande une approche multiparamétrique, non médicamenteuse (kinésithérapie, psychothérapie...) et médicamenteuse. Actuellement, la plupart des traitements sont immunomodulateurs car il est plus facile de trouver une cible du SI qui est bien connue qu'une cible impliquée dans la neurodégénération. Il existe différents traitements modifiant la progression de la pathologie *via* la suppression ou la modulation du système immunitaire avec des médicaments à large spectre, mais également des médicaments immunosuppresseurs très spécifiques tels que les anticorps monoclonaux.

La prise en charge du patient repose, d'une part, sur le traitement des attaques/rechutes aiguës (= apparition ou aggravation des déficits neurologiques durant 24 heures) et d'autre part, sur le traitement de fond *via* l'utilisation de thérapies modificatrices de la pathologie appelées DMT (*Disease-Modifying Therapies*) principalement pour les formes SEP-RR, permettant de diminuer les rechutes et d'augmenter les périodes de rémission. Pour les formes progressives, il y en a très peu et ils ne sont pas vraiment efficaces. Nous allons ici nous concentrer sur les traitements principaux. Les traitements à court-terme des rechutes aiguës permettent l'amélioration des symptômes et la réduction de l'activité immunitaire. En première intention, les glucocorticoïdes (corticoïdes) sont utilisés pour leurs effets anti-inflammatoires afin de gérer rapidement les rechutes. Pour les patients résistants ou réfractaires, des traitements de secondes intentions sont utilisés avec par exemple les hormones corticotropes (ACTH) (Hauser et Cree 2020). La prise en charge de fond des patients repose sur des DMT qui visent à réduire l'inflammation, les lésions démyélinisantes et les rechutes en phase précoce de la maladie, mais aussi à gérer l'aggravation progressive de la pathologie et l'apparition de symptômes invalidants. Ils agissent selon différents mécanismes d'action et sur différents types cellulaires pouvant être complémentaires (**Figure 11**). En 2018, l'ECTRIMS (*European committee for treatment and research in multiple sclerosis*) et l'EAN (*European Academy of Neurology*) ont publié des

recommandations de prises en charge médicamenteuses des patients (Rae-Grant *et al.* 2018). Le DMT est choisi en fonction de la forme de SEP présentée et son activité (nombre de rechutes).

Les traitements de première intention pour les CIS et les SEP-RR moyennement active, les plus utilisés sont : l'interféron bêta, l'acétate de glatiramère et le teriflunomide. Leur utilisation permet une réduction modérée du taux de rechutes et des lésions inflammatoires détectées par IRM et dans une certaine mesure de la gravité de la maladie avec un ralentissement de l'accumulation d'invalidité

L'interféron bêta (IFN β), interféron de classe I dont le mécanisme d'action implique : (1) l'immuno-modulation *via* la régulation à la baisse des molécules de CMH des CPA, (2) la modification de la balance de cytokines pro et anti-inflammatoires vers les cytokines anti-inflammatoires, (3) l'inhibition de la prolifération des lyT et (4) le blocage de la migration des cellules inflammatoires vers le SNC (Kieseier 2011). Les effets indésirables courants comprennent : le syndrome pseudo-grippale, de légères anomalies lors de l'évaluation de laboratoire de routine (augmentation des enzymes hépatiques), une réaction au site d'injection si administration sous cutanée. Ces effets peuvent généralement être gérés avec des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Comi *et al.* 2019).

L'acétate de glatiramère est un sel d'acétate constitué d'un mélange de polypeptides aléatoires composés de quatre acides aminés. Il se fixe fortement au CMH d'autant plus si c'est un complexe CMH-MBP inhibant la réponse T contre la gaine de myéline. Il modifie l'équilibre des cytokines en faveur d'une activité immuno-régulatrice promouvant les Th2 *via* l'IL-5 et l'IL-13 et les Tregs par l'IL-10 et le TGF β (Lalive *et al.* 2011). Il est considéré comme une alternative tout aussi efficace à l'IFN β dans la SEP-RR (Cadavid *et al.* 2009). Les effets indésirables comprennent une réaction au site d'injection, des bouffées vasomotrices, une oppression thoracique, une dyspnée et des palpitations.

Le Tériflunomide, un métabolite actif du Léflunomide, est un immunosuppresseur utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde. Le Tériflunomide inhibe la dihydroorotate déhydrogénase (DHO-DH), une enzyme mitochondriale impliquée dans la synthèse des pyrimidines. Il permet ainsi une inhibition de la prolifération des lymphocytes activés (plus sensibles, car ils présentent un taux de réplication de l'ADN plus important que les lymphocytes naïfs) présumés autoréactifs, mais son mécanisme d'action dans la SEP est encore mal connu (O'Connor 2011). Il présente peu d'effets secondaires : diarrhée, éruption cutanée et affinement des cheveux.

Ensuite, en seconde intention pour des formes de SEP-RR fortement active, différentes stratégies sont possibles ciblant les lyB et la migration des cellules immunitaires vers le SNC. Certaines thérapies

reposant sur la déplétion des lyB matures (*Rituximab, Ocrelizumab et Ofatumumab* ; des anticorps monoclonaux anti-CD20) modulent l'immunité humorale en jouant sur la reconstitution de lyB. L'Ocrelizumab est injecté en intraveineux (i.v) alors que l'Ofatumumab plus récent est injecté en sous-cutané avec un effet similaire. Ces thérapies sont associées : à une interruption de la migration de lyB périphériques vers le SNC, à une présentation réduite de l'antigène, à la modulation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, à une réduction de l'activation et différenciation des plasmablastes (secrétant les immunoglobulines). Ces effets permettent une forte réduction du taux de rechutes dans la forme SEP-RR, d'arrêter le développement de nouvelles lésions dans la substance blanche détectées par IRM et de diminuer la progression silencieuse. Cependant ces thérapies sont associées à un risque accru de développer des infections notamment des réactivations des infections latentes comme un virus de l'herpès ou de la tuberculose (Hauser et Cree 2020).

D'autres stratégies reposent sur l'inhibition de la migration des lymphocytes dans le SNC, en se focalisant sur le « *homing* » des lymphocytes dans le SNC avec le Natalizumab, un anticorps monoclonal inhibiteur de l'intégrine $\alpha4\beta1$. Comme expliquée précédemment, cette intégrine est essentielle au processus d'extravasation des lymphocytes au niveau des barrières du SNC. Le natalizumab est administré par voie i.v une fois toutes les 4 semaines. Il permet de réduire les rechutes et de ralentir la progression de la maladie par rapport au placebo ou aux traitements à l'IFN β (Rudick *et al.* 2006 ; Butkueven *et al.* 2020). Généralement bien toléré, cependant à long-terme dû à un défaut de l'immuno-surveillance du SNC, des risques de leuco-encéphalopathie multifocale progressive peuvent survenir chez 0,4% des patients traités par Natalizumab (Ho *et al.* 2017).). L'autre principal inconvénient du Natalizumab est l'activité « rebond » possible après arrêt du traitement, observé chez les patients non observant ou séroconvertis par le virus JC : cela entraîne l'arrêt immédiat de la thérapie par le Natalizumab.

L'autre stratégie pour inhiber la migration de cellules dans le SNC est la séquestration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques utilisant le Fingolimob (*Fingolimob, Siponimod* ; inhibiteur ou modulateur des récepteurs Sphingosine-1-phosphate (S1p)). Le Fingolimob fut le premier accepté par la FDA et est plutôt bien toléré bien que certains effets secondaires puissent être observés : des anomalies légères lors des évaluations de laboratoire de routine (par exemple une fonction hépatique élevée ou une lymphopénie) (Kappos *et al.* 2014]), des troubles du rythme cardiaque en début de traitement identifié par électrocardiogramme, de l'œdème maculaire, la cryptococcose, le développement d'une leuco-encéphalopathie multifocale progressive et plus rarement le développement d'une varicelle-zona disséminée. Sachant ces effets secondaires importants, un examen ophtalmologique et une vaccination contre le virus de la varicelle-zona pour les personnes séronégatives sont indiqués, suivi d'une période de 6 à 12 heures de surveillance recommandée après

la première injection. L'Ozanimod, un modulateur sélectif des récepteurs S1P récemment approuvé, s'est également avéré efficace dans la SEP-RR, avec une meilleure innocuité et tolérance par rapport au Fingolimob (Comi *et al.* 2019 ; Cohen *et al.* 2019).

D'autres DMT pour la forme RR-SEP existent, mais ils sont moins utilisés : le Mitoxantrone (un intercalant de l'ADN, inhibiteur de la topoisomérase de type II), l'Alemtuzumab (un anticorps anti-CD52, molécule co-stimulatrice) et la Cladribine (un analogue nucléosidique purique permettant la déplétion des lyT en prolifération). Tous ont des avantages prouvés dans la SEP-RR. Cependant, des effets secondaires plus importants limitent leurs utilisations.

D'un autre côté, pour les formes progressives de la SEP, beaucoup moins de DMT ont été approuvés. Pour les formes secondaires progressives (SEP-PS), on retrouve le Siponimob, utilisé pour les formes SEP-SP actives, c'est-à-dire des patients atteints de la forme progressive, mais ayant eu une nouvelle rechute ou des lésions en expansion visibles par IRM. La Cladribine, l'Ocrelizumab et le Fumarate de diroximel peuvent aussi être utilisés dans le cas de SEP-PS active. Pour les formes progressives primaires (SEP-PP), l'Ocrelizumab est le seul DMT approuvé. Le dosage est le même que pour les SEP-RR. Il réduit la progression d'invalidité clinique d'environ 25% et améliore d'autres marqueurs cliniques observés par IRM (diminution du volume des lésions et augmentation du volume cérébral) (Montalban *et al.* 2017).

En complément des DMT, des études sur l'utilisation de vitamines et d'autres cofacteurs sont également en cours (exemple vitamine D ; Ascherio *et al.* 2014). D'autres thérapies sont encore en étude. On peut citer parmi les plus prometteuses, les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (BTKi) dont, l'*Evobrutinib* qui est en essai de phase 2 qui montre des résultats prometteurs (Yang *et al.* 2022).

Le panel de nouveaux traitements est donc de plus en plus efficace, régulant principalement l'inflammation et permettant un contrôle quasi-complet de la SEP-RR où la composante immunitaire est importante. Cela est associé avec une administration simplifiée (fréquence moins importante, voie orale...) permettant une meilleure tolérance, mais surtout observance des patients et améliorant ainsi leurs perspectives sans handicap. Historiquement, un patient atteint de SEP-RR évoluait en SEP-SP dans les 19 années après le début de leur pathologie, mais les nouveaux traitements ont considérablement allongé ce temps (25 ans). Les rechutes ont également été diminuées, voire éliminées. Cependant, il n'existe pas de traitements véritablement efficaces contre les formes de SEP progressives dont la composante est principalement neurodégénérative. Dans ce contexte, il devient nécessaire d'induire des processus de neuroprotection voire de neurorégénération. Le challenge est donc entier et consistera vraisemblablement à combiner plusieurs thérapies en fonction de l'évolution

de la pathologie. Il est donc primordial également de développer de nouvelles thérapies ayant un impact plus important et ciblé sur les processus de neurodégénération dans la SEP.

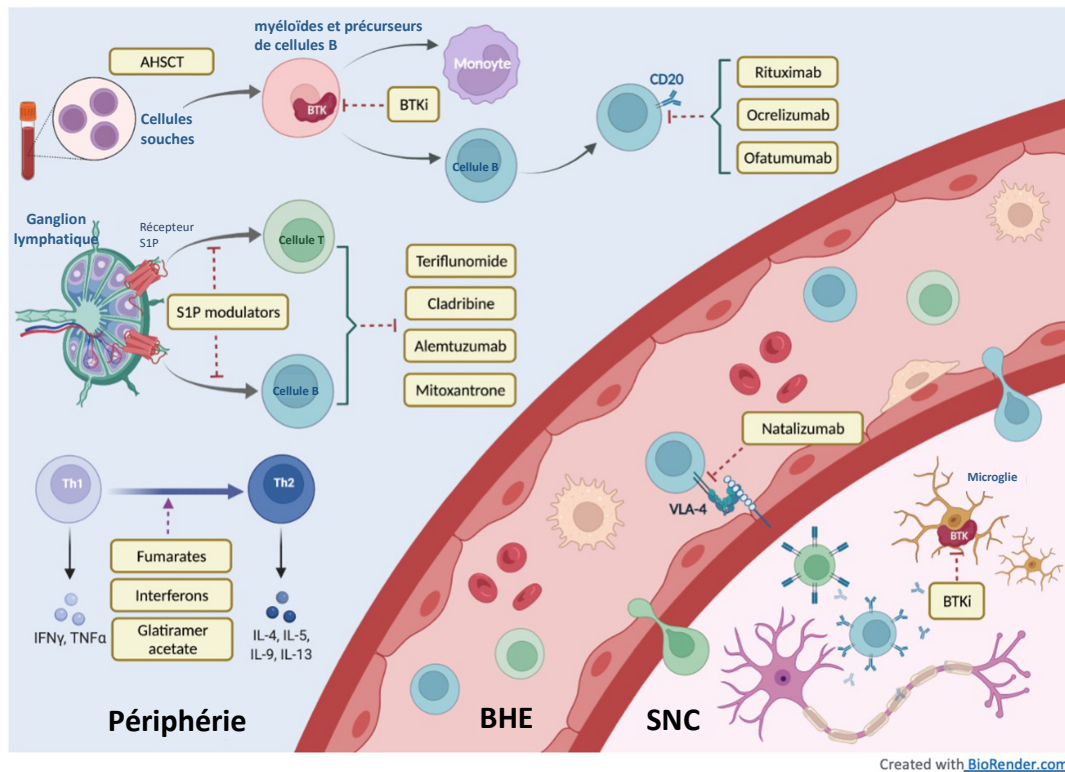


Figure 11 : Les différents mécanismes d'action des DMT. On retrouve les DMT qui jouent un rôle sur la production cytokinique (les interférons, les fumarates et la glatiramère d'acétate) ; ceux jouant un rôle sur la migration dans le SNC (les modulateurs S1P, le Natalizumab) ; ceux induisant une inhibition des lymphocytes B et T (Teriflunomide, Cladribine, Alemtuzumab et Mitoxantrone) ; les thérapies anti-CD20 (Rituximab, Ocrelizumab et Ofatumumab) et enfin les thérapies émergentes (AHSCT et BTKi). D'après Yang et al. 2022.

Chapitre 2. Le récepteur P2X7

2.1 Les généralités

Le récepteur P2X7 (P2RX7) est un récepteur purinergique de la famille P2X qui regroupe des récepteurs canaux ioniques dépendant de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) extracellulaire (ATPe) et présents à la membrane plasmique. Ces récepteurs ont été trouvés dans les métazoaires, les champignons, les amibes et les plantes. Chez les mammifères, P2RX7 est exprimé par un grand nombre de types cellulaires et est impliqué notamment dans l'inflammation. Dans l'immunité, dans un contexte physiologique, il joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire et dans un contexte physiopathologique, il serait impliqué dans les maladies auto-immunes (Cao et al. 2019), neurologiques (Andrejew et al. 2020) et dans le cancer (Grassi et De Ponte Conti 2021).

2.1.1 Découverte

Dès 1971, il a été identifié des neurotransmetteurs nucléosidiques (adénosines) et nucléotidiques puriques (ATP/ADDP/AMP), responsables d'une transmission non adrénergique et non cholinergique dans le système nerveux périphérique. Mais, les récepteurs membranaires qui leur étaient liés, étaient encore inconnus. C'est seulement en 1978 que Burnstock et collaborateurs ont démontré qu'il existait différentes familles de récepteurs pour l'adénosine (appelés récepteurs P1) et pour l'ATP et l'ADP (appelés récepteurs P2). Cependant, l'acceptation générale de la communauté scientifique ne s'est produite qu'au début des années 1990 lorsque les récepteurs ont été clonés et caractérisés. Sur la base de leur pharmacologie et structure, quatre sous-types de récepteurs P1 ont été identifiés : A1, A2A, A2B et A3. Les récepteurs P2 ont été subdivisés en familles ionotropiques P2X (récepteurs de canaux ioniques ligands-dépendants) et métabotropiques P2Y (récepteurs couplés aux protéines G. En 1993, il y a eu le premier clonage d'un récepteur de l'ATP, un récepteur couplé aux protéines G nommé P2Y1 et du récepteur P2Y2. L'année suivante, les deux premiers récepteurs canaux ioniques P2X ont été clonés et caractérisés (Burnstock 2012). Des études menées par plusieurs scientifiques ont approfondi les connaissances sur la physiologie moléculaire des sous-types des récepteurs P2X (**tableau 2**) et P2Y (**tableau 3**). La première structure cristalline du récepteur P2X4 a été une avancée conceptuelle majeure (Kawate *et al.* 2009). Cela a permis de montrer que contrairement à ce qu'il était établi, la plupart des cellules non neuronales du corps expriment plusieurs purinorécepteurs.

Récepteur	Distribution cellulaire principale	Agoniste	Mécanisme de transduction
P2X1	Cellules musculaires lisses, cervelet, corne dorsale des neurones spinaux	ATP	Canal ionique sélectif aux cations (Ca ²⁺ , Na ⁺)
P2X2	Cellules musculaires lisses, SNC, rétines, cellules chromaffines, ganglions sensitifs et autonomes	ATP	
P2X3	Neurones sensoriels, certains neurones sympathiques, colon et testicules	ATP	
P2X4	SNC, colon, testicules	ATP	
P2X5	Cellules en prolifération de la peau, intestin, vessie, thymus, moelle épinière	ATP	
P2X6	SNC, neurones moteurs	ATP	
P2X7	Cellules immunitaires, pancréas, peau...	ATP	Canal ionique sélectif aux cations (Ca ²⁺ , Na ⁺) formation d'un large pore (macropore) lors de stimulation prolongée

Tableau 2 : Les récepteurs P2X. D'après Burnstock and Knight 2004

Récepteur	Distribution principale	Agoniste naturel préférentiel	Mécanisme de transduction
P2Y1	Cellules endothéliales et épithéliales plaquettes, cellules immunitaires, ostéoclastes, cerveau	ATP et ADP	protéine Gq/G11 --> activation PLC-β et production d'IP3
P2Y2	cellules immunitaires, épithéliales et endothéliales, tubules rénales, ostéoclastes	ATP et UTP	protéine Gq/G11 --> activation PLC-β et production d'IP3 et possiblement Gi
P2Y4	cellules endothéliales placenta, rate et thymus	UTP	protéine Gq/G11 --> activation PLC-β et production d'IP3 et possiblement Gi
P2Y6	cellules épithéliales intestinales et pulmonaires, placenta, lyT, thymus, microglie (activée)	UDP	protéine Gq/G11 --> activation PLC-β et production d'IP3
P2Y11	rate, intestin, granulocytes	ATP	protéine Gq/G11 et Gs --> activation PLC-β et production d'IP3 Gs --> activation de la voie adénylate cyclase (ATP-> AMPc)
P2Y12	Plaquettes, cellules gliales	ADP	protéine Gi --> inhibition de l'adénylate cyclase
P2Y13	rate, cerveau, ganglions lymphatiques, moelle osseuse, érythrocytes	ADP	protéine Gi --> voie inhibitrice
P2Y14	Placenta, adipocytes, estomac, intestin, certaines régions du cerveau, mastocytes	UDP et UDP-glucose	protéine Gi/o --> voie inhibitrice

Tableau 3 : Les récepteurs P2Y. D'après Burnstock and Knight 2004

2.1.2 Les récepteurs ionotropiques P2X et P2RX7

Les récepteurs ionotropiques P2X dont fait partie P2RX7 (Di Virgilio *et al.* 2017) sont des canaux cationiques trimériques membranaires non sélectifs. Ils sont importants pour de nombreux événements physiologiques, notamment la réponse immunitaire et la transmission neuronale. Leur agoniste étant l'ATP, en présence d'ATP les canaux P2X s'ouvrent entraînant un influx de Ca^{2+} et de Na^+ et un efflux de K^+ (**Figure 12**). La famille des récepteurs P2X est composée de 7 membres de P2X1 à P2X7 (**Tableau 2**) : chacun présente une affinité pour l'ATP, un profil de désensibilisation et une cinétique d'activation/désactivation qui leur sont propres. Une des grandes différences entre P2RX7 et les autres récepteurs P2X est qu'il nécessite de plus fortes concentrations d'ATP pour s'activer. En effet, contrairement aux autres récepteurs dont l'EC50 (la concentration efficace correspondant à la moitié de la réponse maximale) d'ATP est de l'ordre du micromolaire (0,1-10 μ M), alors que pour P2RX7, il est de l'ordre de la centaine de micromolaire (200-400 μ M), (Jacobson and Muller 2016). Ce seuil d'activation élevé et sa désensibilisation relativement lente font de P2RX7, une molécule particulièrement pertinente dans les états inflammatoires chroniques (Andrejew *et al.* 2020 ; Calzaferrri *et al.* 2020).

Les P2RX7 humains et murins possèdent des caractéristiques spécifiques à leur espèce. Le récepteur humain a une plus grande affinité pour le Benzoylbenzoyl-ATP (BzATP, un agoniste synthétique des P2X) et l'ATP (respectivement EC50 : 20 μ M et 100 μ M) par rapport au récepteur murin (respectivement EC50 : 295 μ M et 850 μ M) (Moore and Mackenzie 2008). Le P2RX7 humain a une vitesse de désactivation plus élevée que celle d'autres récepteurs de mammifères : cela dépendrait de la région C-terminale du récepteur (Bartlett *et al.* 2014). Le P2RX7 qu'il soit humain ou murin subit des modifications post-traductionnelles telles que la N-glycosylation ou la palmitoylation. Par immunoprécipitation (Kim *et al.* 2001) ; Guo *et al.* 2007) ou par stratégie de double hybride chez la levure (Wilso *et al.* 2002), des protéines interagissant avec la queue C-terminale de P2RX7 ont pu être identifiées. On peut notamment citer les protéines transmembranaires ou intracellulaires : les protéines de choc thermique (*Heat shock protein* HSP), les protéines du cytosquelette, les kinases et le récepteur P2X4 (P2RX4) ou la pannexin-1 (Panx1, canal transmembranaire). Cette dernière médierait l'ouverture de pores dépendants de P2RX7, la libération d'IL-1 β et d'ATP (Baroja-Mazo *et al.* 2013).

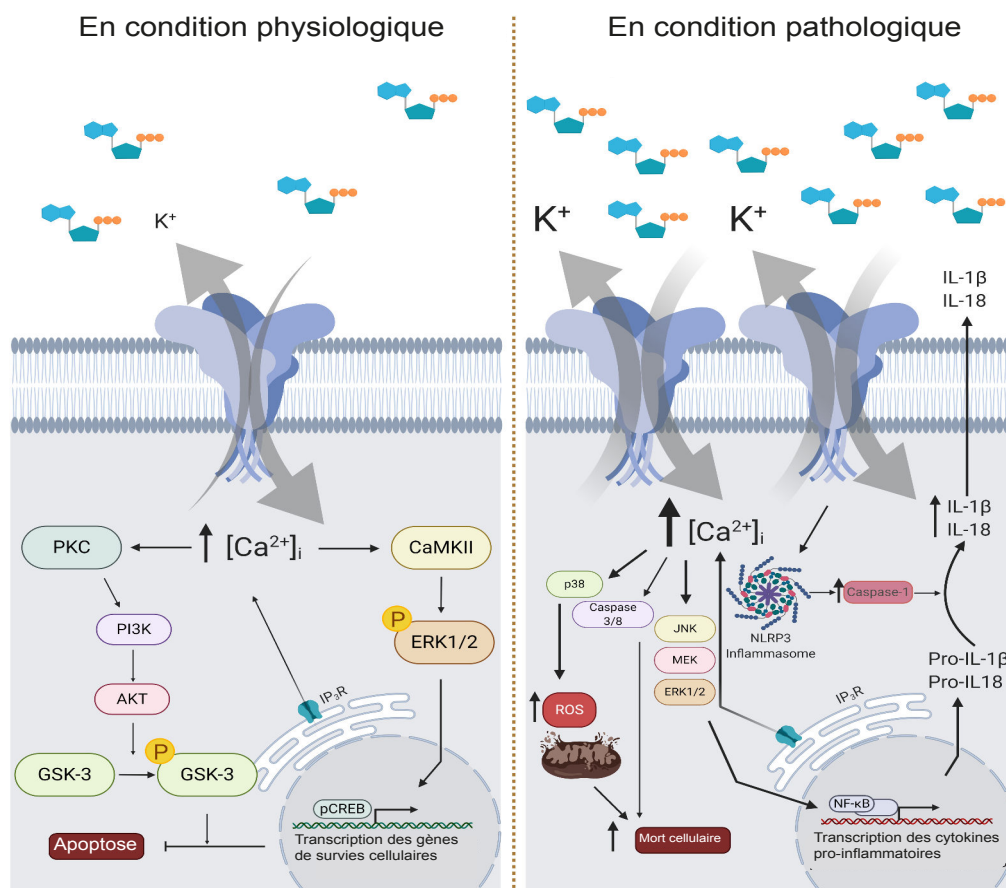


Figure 12 : Voies de signalisation intracellulaire du récepteur P2X7. Le récepteur P2X7 (P2RX7) est assemblé sous forme de protéine homotrimerique et, lors de la liaison à l'ATP, les sous-unités du récepteur changent leur état conformationnel permettant l'ouverture d'un pore entraînant l'entrée des

cations (Na^+ et Ca^{2+} , principalement Ca^{2+}). Dans des conditions physiologiques (panneau de gauche), la hausse des niveaux de concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) conduit à l'activation de certaines kinases, comme la protéine kinase C (PKC) et la calcium-calmoduline kinase II (CaMKII), qui phosphorylent et activent la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), les kinases extracellulaires régulées par le signal 1/2 (ERK1/2), la protéine kinase B (AKT) et la glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Cette transduction de signal entraîne une inhibition de l'apoptose ou une augmentation de la transcription des gènes liés à la survie cellulaire. Dans des conditions pathologiques (panneau de droite), comme dans la sclérose en plaques (SEP), les taux d'expression de P2RX7 sont augmentés. L'augmentation de l'activation de P2RX7 peut entraîner une libération accrue d'interleukine 1β (IL- 1β) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), mais une inhibition accrue de GSK3. La libération d'IL- 1β dépend de la formation de l'inflammasome NLRP3 ainsi que de l'activation des lymphocytes B activés par le facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer (NF- κ B). Ces événements contribuent à augmenter la mort cellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoires. D'après Andrejew et al. 2020.

2.1.3 Les sources d'activation et de modulation

Le principal ligand naturel de P2RX7 est l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) extracellulaire (ATPe) que ce soit chez l'homme ou la souris. En situation physiologique, l'ATP est principalement présente en intracellulaire (1 à 10 nM) et très peu en milieu extracellulaire (nanomolaire) (Trautmann 2009). L'ATP est produite par la glycolyse ou la phosphorylation oxydative, puis elle est libérée dans l'espace extracellulaire. Longtemps, il était supposé que la source principale d'ATPe venait des cellules endommagées ou mourantes par passage passif lors de l'apoptose ou de la nécroptose (Burnstock 2012). Cependant, il est maintenant connu que l'ATPe peut être libérée de cellules non endommagées en réponse à une perturbation mécanique légère (Homolya et al. 2000), à l'hypoxie et à certains agents pathogènes (McNamara et al. 2001). Cette libération d'ATPe peut se faire par différents mécanismes : l'exocytose des granules de sécrétion, le transport vésiculaire, les canaux membranaires (transporteurs ABC ou transporteurs à cassettes liant l'ATP, *ATP binding cassette*), les pannexines (Chekeni et al. 2010) et les connexines (*Gap Junction protein*, protéine de jonction communicante) (Anselmi et al. 2008). Cette libération a lieu dans de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales et urothéliales, les astrocytes, les macrophages, les ostéoblastes et les odontoblastes (Lazarowski et al. 2011). On en sait maintenant beaucoup plus sur les ectoenzymes impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP libérée en ADP, AMP, adénosine, inosine et hypoxanthine (Zimmermann 2006 ; Yegutkin 2008). Ces enzymes comprennent les NTPDases, les NPP, les phosphatases alcalines, la 5'-nucléotidase et la monoamine oxydase. Ces ectoenzymes permettent donc une régulation des concentrations extracellulaires d'ATP, de NAD^+ ainsi que d'autres nucléotides extracellulaires, et permettent leur conversion en plusieurs métabolites bio actifs (Giuliani et al. 2019 ; Boison and Yegutkin 2019). L'ATPe joue donc un rôle majeur dans de nombreuses voies de signalisation ayant une implication dans de multiples phénomènes physiologiques tels que les voies autocrines et paracrines régulant le

métabolisme cellulaire, la migration, la prolifération et l'apoptose *via* les récepteurs purinergique P2Y et P2X.

L'ATP n'est pas le seul métabolite naturel pouvant activer P2RX7. Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) permet d'activer une voie de P2RX7 indépendante de l'ATP dans les lymphocytes T murins. Ce mécanisme indépendant de l'ATP implique ARTC2.2, une ecto-ADP-ribosyltransferase qui catalyse, en présence de NAD⁺, l'ADP-ribosylation de l'arginine en position 125 dans le domaine extracellulaire de P2RX7, proche de la poche de liaison à l'ATP. Cette modification post-traductionnelle covalente permet une activation perpétuelle de P2RX7, qui est spécifique de l'espèce murine. En effet, l'ADP-ribosyl transférase ARTC2.2 codée par le gène *Art2b* est exprimée de manière différente entre l'Homme et la souris. La souris possède deux copies actives du gène contrairement à l'homme, où la transcription du seul gène orthologue est silencieuse due à trois codons stop. Par conséquent, seul le P2RX7 murin est soumis à l'ADP-ribosylation à Arg¹²⁵ (Sluyter 2017). Ce mécanisme est uniquement observé chez les lymphocytes T murins et pas les macrophages. Cela est peut-être dû à la présence d'isoformes différentes. En effet, chez la souris contrairement à l'homme, P2RX7 possède deux isoformes N-terminales codées par P2RX7-a et P2RX7-k. Le variant P2RX7-k prédomine dans les lyT et est sensible à l'ADP-ribosylation contrairement au variant P2RX7-A (*cf.* 2.2.3 Variants de P2RX7). La concentration en NAD⁺ est de 1 mM en intracellulaire et de l'ordre de 0,1 µM en concentration plasmatique (Adriouch *et al.* 2007). Le NAD⁺ est stocké et utilisé par les mitochondries à des fins métaboliques, mais apparemment, de grandes quantités peuvent être libérées lors d'une lyse cellulaire ou par des processus non lytiques, dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques telles que l'hypoxie, l'inflammation et l'activation mécanique ou chimique *via* notamment la connexine 43 (Adriouch *et al.* 2007). Cela permet d'avoir une concentration élevée de NAD entraînant l'ADP-ribosylation des protéines membranaires des cellules voisines, exprimant des enzymes de la classe des ADP-Ribosyl transferase (par exemple ARTC2.2 qui est impliquée dans la régulation immunitaire) (Adriouch *et al.* 2008 ; Haag *et al.* 2007). Le NAD⁺ joue donc un rôle essentiel dans la réponse cellulaire au stress.

D'autres agonistes, antagonistes et modulateurs allostériques de P2RX7 sont, soit présents dans la nature, soit développés par synthèse (De Marchi *et al.* 2016 ; Jacobson and Müller. 2016). Finalement, P2RX7 présente une faible affinité pour son ligand naturel, l'ATP par rapport à certains agonistes synthétiques. Le plus connu est le 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adénosine-5'-triphosphate (Bz-ATP) bien qu'il ne soit pas sélectif de P2RX7 et soit aussi un agoniste d'autres récepteurs P2X (P2RX1, P2RX2, P2RX3 et P2RX4). D'autres molécules naturelles non nucléotidiques ont aussi été rapportées pour jouer un rôle d'agonistes ou de modulateurs allostériques positifs pour P2RX7 tels que notamment le peptide dérivé de la cathélicidine LL-37 (un peptide anti-microbien) (Elssner *et al.* 2004 ; Tomasinsig *et*

al. 2008) et l'amyloïde β (Sanz *et al.* 2009). D'autres modulateurs allostériques positifs P2RX7, dont il a été démontré qu'ils augmentent la perméabilité membranaire dépendante de P2RX7 aux grands solutés, comprennent des médicaments, des antibiotiques comme la polymyxine B (Ferrari *et al.* 2004) et des produits dérivés de plantes tels que le Tenidap (Sanz *et al.* 1998) et les ginsénosides (Helliwell *et al.* 2015). De même, plusieurs inhibiteurs, antagonistes ou modulateurs allostériques négatifs ont été développés. Les plus classiques comprennent l'ATP oxydé (oATP), le bleu brillant G (BBG) et le KN62. Plus récemment, des antagonistes/modulateurs allostériques plus puissants et sélectifs ont été produits tels que AZ10606120, A740003 et son dérivé A438079 (De Marchi *et al.* 2016 ; Adinolfi *et al.* 2012 ; Adinolfi *et al.* 2015 ; Amoroso *et al.* 2015).

2.2 La structure et l'expression du récepteur P2X7

2.2.1 Structure

P2RX7 est un récepteur canal ionique trimérique et ATP dépendant. Initialement, P2RX7 a été identifié comme un récepteur P2Z dû à son activation seulement avec de fortes concentrations en ATP contrairement aux autres récepteurs P2X. Finalement, sa similitude en termes de séquences d'acides aminées, lui a permis d'appartenir à la famille P2X. Ce gène est présent dans 55 espèces, comprenant 13 exons. Les gènes codant pour P2RX7 murin et humain sont respectivement localisés sur les chromosomes 5 et 12 (12q24.31) dans une région de syntenie conservée (Martinez-Cuesta *et al.* 2020). P2RX7 a été caractérisé chez l'Homme et 6 autres mammifères (macaque, chien, panda, souris, rat et cobaye). Ces espèces ont plus de 75 % d'homologies avec le P2RX7 humain. Dans des espèces non-mammifères telles que le poisson zèbre, l'homologie est moins de 40 % (Sluyter 2017). P2RX7 possède la sous unité monomérique la plus grande de la famille P2X, possédant une longueur de 595 acides aminés pour les récepteurs humains, de rats, de souris, de chiens et de macaques (Sluyter 2017); Bradley *et al.* 2011). Les domaines transmembranaires et extracellulaires des récepteurs P2X ont un arrangement structurel secondaire et quaternaire similaire, ce qui est attendu au vu de leur homologie de séquence élevée. Comme illustré sur la Figure 13, chaque monomère du P2RX7 possède : deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2) α hélicoïdaux (respectivement $\alpha 1$ et $\alpha 6$) impliqués dans la fermeture du canal et dans la sélectivité du pore ionique et un domaine extracellulaire contenant quatorze feuillets β ($\beta 1 - \beta 14$) et quatre hélices α ($\alpha 2 - \alpha 5$). Ainsi, la structure tridimensionnelle de P2RX7 souvent comparée à la forme d'un dauphin, est constituée d'une grande boucle extracellulaire glycolysée composant la tête, le corps, la nageoire dorsale, les nageoires, 2 domaines transmembranaires alpha-hélicoïdaux hydrophobes (TM1 et TM2) et des queues carboxyle (C) et amino (N) terminales intracellulaires respectivement longue et courte, composant la queue et la nageoire, avec les sites de liaison à l'ATP à l'interface entre les monomères (**Figure 13A**) (Jiang *et al.* 2021). Le domaine extracellulaire et les hélices α formant TM1 et TM2 sont reliés par une structure

rigide appelée bielles (par analogie avec la tige rigide destinée à la transmission du mouvement entre deux pièces mobiles en mécanique). Ces bielles sont formées de plusieurs brins β antiparallèles dont β_1 , β_2 , β_8 , β_9 , β_{11} et β_{12} dans le bas du corps et β_{13} et β_{14} dans le haut du corps (Browne *et al.* 2010).

Le premier P2RX7 cristallisé fut celui du panda. Grâce à un modèle informatique fondé sur cette structure cristalline ainsi que celle du P2RX4 du poisson zèbre et du P2RX3 humain, le P2RX7 humain a pu être modélisé (Karasawa and Kawate 2016). Cela a donné une structure tridimensionnelle de 3 sous-unités monomériques assemblées en un récepteur homotrimérique. Les monomères de P2RX7 peuvent également, bien que très rarement, s'hétérotrimériser avec d'autres membres de la famille P2X, principalement avec des monomères de P2RX4 et plus rarement P2RX2 et P2RX5. Ainsi, certains P2X peuvent contribuer à des fonctions cellulaires de P2RX7 (Martínez-Cuesta *et al.* 2020). Ces expériences de modélisation n'ont pas été réalisées pour les rongeurs. Cependant, leur structure est probablement semblable à la structure humaine compte tenu du fort pourcentage partagé d'identité de séquence (77 à 85%). De plus, l'étude des complexes natifs de P2RX7 de rat soutient l'arrangement trimérique de P2RX7 du rongeur (Nicke 2008). Des études de la cinétique d'activation d'un seul canal (Ding and Sachs 1999) et les courbes de réponse en fonction des concentrations d'ATP (Jiang *et al.* 2003) suggèrent que P2RX7 possède trois poches de liaison à l'ATP (**Figure 13B**) (Hattori and Gouaux 2012). Des études de mutagenèse sur les récepteurs P2X de mammifères ont permis d'identifier plusieurs résidus conservés importants pour activer le récepteur dans le domaine extracellulaire : 6 résidus hydrophiles Lys⁶⁴, Lys⁶⁶, Thr¹⁸⁹, Asn²⁹², Arg²⁹⁴ et Lys³¹¹ dans le récepteur P2RX7 du rat. Cela renforce l'idée que la liaison à l'ATP se produit à l'interface entre deux sous-unités (McCarthy *et al.* 2019). La poche de liaison à l'ATP est constituée de la tête, du haut du corps et de la nageoire gauche d'une sous-unité, ainsi que du bas du corps et de la nageoire dorsale de la sous-unité adjacente (Jiang *et al.* 2021). L'ATP est en forme de « U » lorsqu'il se lie au site de liaison et interagit alors avec les 6 acides aminés hydrophiles déterminés précédemment. Lorsque les trois résidus sont fixés, cela permet l'ouverture du pore du domaine bas du corps, formé par le domaine transmembranaire central des trois sous-unités. De plus, juste à côté de ces poches de liaison à l'ATP se trouvent des poches de liaison aux médicaments (**Figure 13 B**), permettant la fixation de composés aux propriétés inhibitrices et/ou allostériques modulatrices du P2RX7 (Karasawa and Kawate 2016), tels que les peptides (Elssner *et al.* 2004), des médicaments comme le Tenidap (Sanz *et al.* 1998), des antibiotiques comme la Polymyxine B (Ferrari *et al.* 2004) et des dérivés de plantes (Helliwell *et al.* 2015).

Les parties N- et C-terminales intracellulaires des sous-unités présentant des motifs d'interaction avec des protéines kinases, jouent un rôle important dans la fonction biologique de P2RX7, mais le détail de la structure complète reste non résolu. P2RX7 possède une extrémité C-terminale plus longue que les autres membres de la famille P2X avec 200 acides aminés en plus (Stokes *et al.* 2010). Cette queue C-

terminale contient un domaine riche en cystéine et un domaine de liaison aux lipopolysaccharides, ce qui est unique à P2RX7 au sein de la famille P2X. Cette terminaison permet ainsi la modulation de l'activation des voies de signalisation et des modifications post-traductionnelles (Stokes *et al.* 2010). Quant à l'extrémité N-terminale, elle possède un site spécifique pour la protéine kinase C qui régule la désensibilisation de P2RX7 (Allsopp and Evans 2015). Elle contrôlerait également le flux de Ca^{2+} au travers du canal (Jiang *et al.* 2000) et faciliterait l'activation du récepteur (Roger *et al.* 2010). Il a été montré que des mutations dans cette extrémité N-terminale entraînaient des modifications de la perméabilité de P2RX7 aux cations organiques chez le rat (Liu *et al.* 2008) ou une hypersensibilité du P2RX7 humain entraînant une déplétion en cholestérol de la membrane plasmique (Chong *et al.* 2010). P2RX7 ne se désensibilise pas comme les autres P2X, c'est une caractéristique liée à un motif intracytoplasmique appelé « ancre C-cystéine » codé par l'exon 11. Une étude par cryomicroscopie électronique a mis en évidence la structure cytoplasmique du récepteur pleine longueur, montrant ainsi comment une palmitoylation de l'ancre C-cys empêche la désensibilisation du récepteur (McCarthy *et al.* 2019). Dans cette même étude, une autre spécificité de P2RX7 a été observée : son support cytoplasmique C-terminal (exon 13) unique contient un complexe d'ions zinc et un site de liaison aux nucléotides guanosines (**Figure13**).

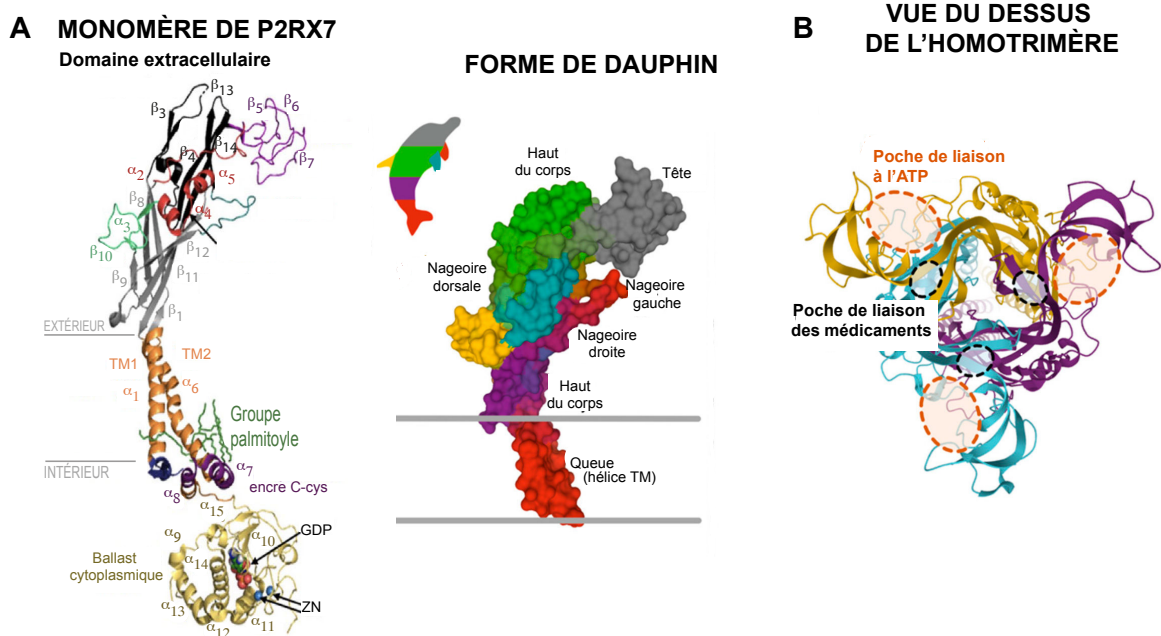


Figure 13 : Structure du P2RX7. A. Le monomère de P2RX7 représenté sous la forme de structure secondaire (à gauche) et de surface moléculaire (à droite) ressemblant à un dauphin. Sa structure secondaire est composée de cinq domaines : extracellulaire, transmembranaire 1 (TM1), transmembranaire 2 (TM2), intracellulaires N-terminal et C-terminal. Les domaines transmembranaires (TM1 et TM2) sont α -hélicoïdaux (respectivement α_1 et α_6) et le domaine extracellulaire contient quatorze brins β (β_1 – β_{14}) et quatre hélices α (α_2 – α_5). Les bielles sont formées par de multiples brins β antiparallèles dans les corps supérieur et inférieur, et relient le domaine extracellulaire aux domaines TM1 et TM2. L'extrémité C-terminale distale de chaque sous-unité, y

comprenant $\alpha 9$ à $\alpha 16$ et $\beta 16$ à $\beta 18$, constitue le ballast cytoplasmique qui contient un site de liaison GDP et deux sites de liaison Zn^{2+} . Le domaine riche en cystéine, reliant l'hélice α de TM2 à la coiffe cytoplasmique, est articulé à la membrane plasmique en tant qu'ancre C-cys via des groupes palmitoylés. **B.** Vue de dessus de la structure du P2RX7 englobant les trois poches extracellulaires de liaison à l'ATP (lignes pointillées orange) et les trois poches supplémentaires de liaison aux médicaments (lignes pointillées noires). D'après Martínez-Cuesta et al 2020.

2.2.2 Distribution tissulaire et cellulaire

Désormais, il est reconnu que le P2RX7 a une distribution large avec des niveaux d'expression très variables chez les mammifères (Burnstock and Knight 2004). Initialement, il était rapporté que P2RX7 était exprimé uniquement dans les cellules hématopoïétiques, c'est-à-dire les macrophages, les cellules dendritiques, les monocytes, les lymphocytes et les érythrocytes (Sluyter 2015), les ostéoclastes (Collo 1997), les mastocytes et les éosinophiles. Pour les neutrophiles, ils semblent ne pas l'exprimer à la surface, mais en intracellulaire. Aujourd'hui, il est clair que P2RX7 est exprimé sur d'autres lignées, notamment : des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales ; mais également sur les cellules du rein, du tractus urinaire et reproductif, les glandes exocrines (pancréas, glandes salivaires) et endocrines (glandes pituitaires) (Woods et al. 2012), les cellules musculaires lisses (Burnstock and Knight 2004). P2RX7 est également exprimé par les cellules des systèmes nerveux central et périphérique, et plus particulièrement au niveau des cellules gliales (la microglie, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann) (Sperlágh et al. 2006 ; Kaczmarek-Hajek et al. 2018), dans certaines régions de l'hippocampe (les cellules pyramidales du CA3, Metzger et al. 2017) et les cellules de Bergmann (astrocytes radiaux du cortex cérébelleux, Habbas et al. 2011). Quant aux neurones, l'expression de P2RX7 reste controversée (Kaczmarek-Hajek et al. 2018). En effet, certaines études rapportent une expression de P2RX7 par les neurones de la moelle épinière (Wang et al. 2004) et au niveau du cerveau, dans certains types de neurones comme les neurones du granule cérébelleux, les neurones de l'hypothalamus, de la substance noire (*substantia nigra*) ou le striatum dorsal (Burnstock and Knight 2004 ; Sánchez-Nogueiro et al. 2005). Il serait cependant absent dans les neurones corticaux et les neurones sensitifs (Burnstock and Knight 2004 ; Cotrina and Nedergaard 2009 ; Wiley et al. 2011). Or, une étude récente de Kaczmarek-Hajek et collaborateurs (2018) avec des souris transgéniques surexprimant le P2RX7 et exprimant une protéine fluorescente sous contrôle du promoteur du P2RX7, a montré dans des conditions physiologiques que dans le SNC, le récepteur n'a pas été détecté dans les neurones, même s'il n'est pas à exclure une expression neuronale inférieure au seuil de détection. Cependant, dans cette étude, même lors de l'induction de lésions tissulaires, pratiquement aucune expression de P2RX7 dans des types de cellules cérébrales autres que la microglie ou les oligodendrocytes n'a été observée. Cela suggère donc que la neurodégénérescence induite par l'activation de P2RX7 est due à un effet indirect, par exemple, *via*

un effet de la glie activée par P2RX7 (Kaczmarek-Hajek *et al.* 2018). Une étude plus approfondie est donc nécessaire pour trancher quant à l'expression de P2RX7 au niveau neuronal. Il est exprimé également au niveau des yeux, notamment dans les cellules ganglionnaires de la rétine, la couche plexiforme interne de la cornée et les cellules de Müller (Burnstock and Knight 2004 ; Cotrina and Nedergaard 2009).

2.2.3 Polymorphisme et Variants de P2RX7

Le P2RX7 humain est fortement polymorphe avec plus de 13 000 polymorphismes mononucléotidiques (*single nucleotide polymorphism*, SNP) déjà identifiés (Benzaquen *et al.* 2019 ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) et avec plus de 150 SNP non-synonymes dans la boucle extracellulaire et dans le domaine C-terminal qui conduisent à diverses conséquences fonctionnelles imprévisibles (Wiley *et al.* 2011 ; Bartlett *et al.* 2014). Certains sont liés à l'activité du récepteur : 10 variants de perte de fonction et 3 variants de gain de fonction (Sluyter *et al.* 2017 ; Benzaquen *et al.* 2019). Plusieurs SNP de P2RX7 sont associés à des pathologies comme par exemple des troubles de l'humeur (Barden *et al.* 2006 ; McQuillin *et al.* 2009) à l'ostéoporose (Panupinthu *et al.* 2008 ; Ohlendorff *et al.* 2007), à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Gu *et al.* 2013).

Différents variants d'épissage ont été identifiés. Il y a, par exemple, des exons supplémentaires codant pour des protéines plus longues ou plus courtes (Cheewatrakoolpong *et al.* 2005 ; Feng *et al.* 2006 ; Masin *et al.* 2012 ; Nicke *et al.* 2009). Ces variants d'épissage de P2RX7 sont spécifiques à l'espèce. À ce jour, 20 variants d'épissage humains sont répertoriés dans les bases de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (De Salis *et al.* 2022). Les plus connus sont au nombre de 13 variants humains (P2RX7-A à J, P2RX7V3 et P2RX7-nf) et 5 variants d'épissage murins (P2RX7-a, 13b, 13c, d et k). Le principal variant fonctionnel dans les deux espèces est la forme P2RX7-A ou P2RX7-a, la forme dite « pleine longueur » de 595 acides aminés (Sluyter and Stokes 2011 ; Pegoraro *et al.* 2021). Selon le variant exprimé, le récepteur adopte un comportement distinctif (**Figure 14**).

Chez l'Homme, les variants peuvent être tronqués pour l'extrémité C-terminale (P2RX7-B, C, E et G) et/ou présentent une perte d'un ou plusieurs exons codant le domaine extracellulaire (P2RX7 C à F). De plus, des variants ayant des exons supplémentaires peuvent entraîner une protéine sans premier domaine transmembranaire (TM1) (P2RX7 G et H). La plupart des variants de P2RX7 tronqués pour la queue C-terminale (variants C, E et G) sont non fonctionnels ou présentent une réponse agoniste limitée, agissant comme régulateur négatif du récepteur natif entier (à l'exception de l'isoforme P2RX7-B humaine). Les variants B et J sont exprimés dans des conditions normales et/ou pathologiques et interfèrent avec les réponses biologiques induites par P2RX7. Le variant P2RX7-B comprend entre ces exons 10 et 11, un intron conduisant à un codon stop engendrant une protéine tronquée sans les

249 derniers acides aminés de la protéine complète, mais contenant 18 acides aminés alternatifs situés après le second domaine transmembranaire (TM2, cf. 2.2.1 Structure). En outre, P2RX7-B est exprimé dans de nombreuses cellules eucaryotes, avec une distribution tissulaire semblable au variant pleine longueur (P2RX7-A) (Cheewatrakoolpong *et al.* 2005 ; Adinolfi *et al.* 2010). C'est le variant le plus exprimé après la forme P2RX7-A. Il peut former des canaux fonctionnels, mais il ne peut pas former le grand pore de conductance, posant ainsi la question sur sa capacité à moduler positivement les activités de P2RX7 (Adinolfi *et al.* 2010 ; Giuliani *et al.* 2014, Cheewatrakoolpong *et al.* 2005). Néanmoins, il a été montré que l'hétéro-trimère P2RX7-A/P2RX7-B était plus efficace que l'homotrimère P2RX7-A notamment concernant la croissance cellulaire (Adinolfi *et al.* 2010).

Le P2RX7-J est produit par un épissage alternatif de l'exon 8 conduisant à un décalage du cadre de lecture donnant un codon stop. La protéine tronquée produite est composée de 258 acides aminés dont 10 acides aminés alternatifs à l'extrémité C-terminale. Il est formé de l'extrémité N-terminale, du premier domaine transmembranaire et d'une partie de la boucle extracellulaire (2/3). Seul, il est non fonctionnel, mais comme le variant P2RX7-B, il est aussi capable de s'assembler aux sous-unités P2RX7-A pour former un récepteur hétérotrimérique. Dans son cas, il a un effet antagoniste sur l'homotrimère P2RX7-A et joue un rôle dans la protection cellulaire (effet anti-apoptotique) (Feng *et al.* 2006 ; Guzman-Aranguez *et al.* 2017). Les autres variants (Variants H, D et F, I) sont retrouvés, mais de manière moins importante et leurs rôles ne sont pas encore bien définis. De plus, de nouveaux variants ont récemment été identifiés chez l'humain, dans des conditions tumorales, le variant P2RX7-V3 et le variant P2RX7-nf. (Pan *et al.* 2016, Gilbert *et al.* 2019).

Chez la souris, moins de variants ont été observés. Il a été montré, dans certaines études, que certains variants alternatifs tels que P2RX7-k et P2RX7-c étaient fonctionnels et pouvaient jouer un rôle dans des processus biologiques comme la croissance cellulaire, la mort cellulaire ou encore l'inflammation (Cheewatrakoolpong *et al.* 2005 ; Feng *et al.* 2006 ; Adinolfi *et al.* 2010 ; Stokes *et al.* 2010 ; Bartlett *et al.* 2014). Il y a deux variants (P2RX7-b et -c) qui sont dus à une délétion de l'exon 13 donnant une protéine raccourcie et qui exhibent donc une activité canal plus faible (Sluyter 2017). La forme, la plus courte est l'isoforme P2RX7-d avec une troncature dans la boucle extra-cytoplasmique et une perte du second domaine transmembranaire et de la queue C-terminale intracytoplasmique. Malgré cela, elle reste capable d'être correctement insérée au niveau de la membrane lorsqu'elle forme un hétérotrimère avec P2RX7-a, permettant à P2RX7-d de réguler à la baisse la formation du macropore induit par l'ATP_e (Kido *et al.* 2014). Le variant P2RX7-k résulte d'un épissage alternatif de l'exon 1 remplacé par l'exon 1'. Cela conduit à un récepteur qui possède donc une extrémité cytoplasmique N-terminale et une première partie du premier domaine transmembranaire différente. Ce variant

possède une sensibilité accrue à l'ATP, aux agonistes et une formation favorisée du pore (Nicke *et al.* 2009). De plus, il peut également être activé par la voie d'ADP-ribosylation comme expliqué précédemment (Schwarz *et al.* 2012). Cependant, à ce jour, ce variant a été observé uniquement chez les rongeurs et n'a pas encore été décrit chez l'Homme. L'ARNm de ce variant est exprimé dans tous les tissus, mais il est retrouvé majoritairement dans le foie et la rate, et de façon plus importante que la forme P2RX7-a exprimé exclusivement par les lymphocytes T. Aucun hétérotrimère P2RX7-k/P2RX7-a a été décrit (Benzaquen *et al.* 2019).

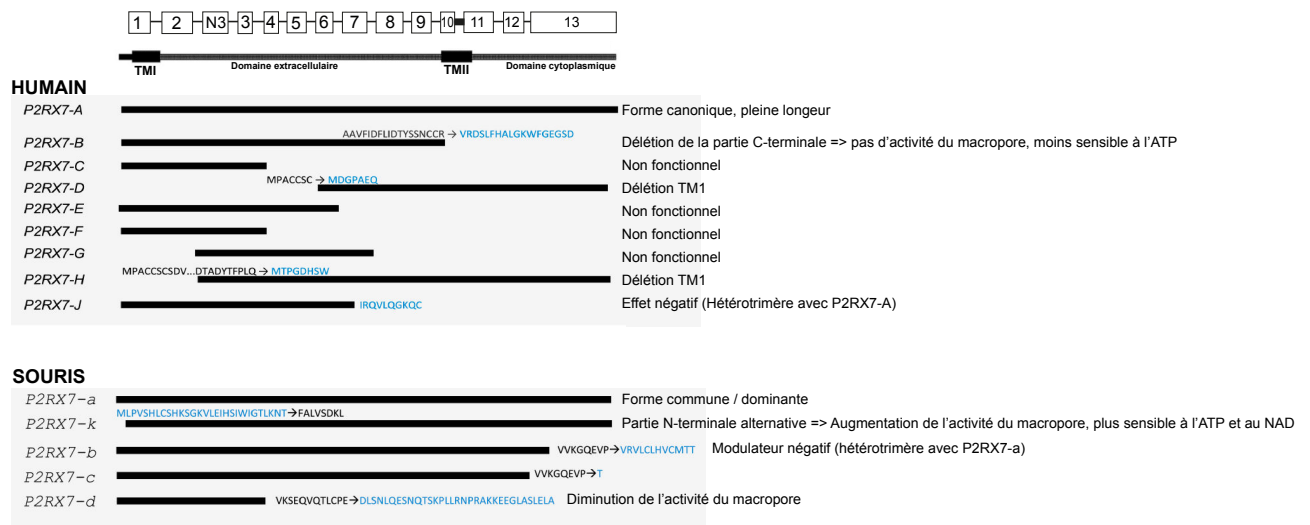


Figure 14 : Les variants d'épissage du P2RX7 humain et murin. Liste et taille des variants humains et murins ainsi que leurs mutations. D'après Benzaquen *et al.* 2019.

2.3 Fonctions du récepteur P2X7

La signalisation purinergique intervient donc dans des situations physiologiques telles que la neurotransmission, neuromodulation, la sécrétion, la chimio-attraction, l'agrégation plaquettaire et l'inflammation aigue, mais également dans la prolifération à long-terme, la différenciation cellulaire, la mort cellulaire au cours du développement et la régénération ou l'excitation de muscles lisses (Burnstock and Knight 2004). P2RX7 ne fait pas exception et possède diverses fonctions dans beaucoup de populations cellulaires distinctes et dans de nombreuses pathologies. Dans le cadre de ce manuscrit de thèse, nous allons nous focaliser sur ses actions dans deux systèmes impliqués dans la SEP, le système immunitaire et le système nerveux central.

2.3.1 Voies de signalisation

Lorsque P2RX7 est activé par l'ATP, il agit comme un canal ionique régulant l'influx cellulaire de sodium (Na^+) et de calcium (Ca^{2+}) et l'efflux de potassium (K^+) (Surprenant *et al.* 1996). Cela conduit alors à une augmentation de la concentration Na^+ intracellulaire et de ce fait à une dépolarisation de la membrane. L'influx de Ca^{2+} lui déclenche les voies de signalisation dépendantes du calcium. De plus,

lors de stimulations prolongées ou en présence de concentrations élevées d'agonistes (mM), le P2RX7 peut grâce à sa longue queue intracellulaire former un pore non sélectif appelé macropore ou « large pore » perméable à des composés jusqu'à 900 daltons (Surprenant *et al.* 1996 ; Falzoni *et al.* 1995 ; Virgino *et al.* 1999). Cette caractéristique évite à P2RX7 une désensibilisation à long-terme et une cytotoxicité due à une stimulation répétée, mais permet à l'inverse une augmentation progressive de son activité que l'on appelle « facilitation » (Roger *et al.* 2008 ; Surprenant *et al.* 1996). De plus, l'activation de P2RX7 déclenche des voies de signalisation spécifiques du type cellulaire, notamment l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 (Sanz and Virgilio 2000). Cette activation de l'inflammasome NLRP3 passe par sa voie canonique qui comprend 2 signaux (« *priming* » et activation). Le 1^{er} signal dit de « *priming* » passe par les récepteurs de l'immunité innée dont notamment les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR, « *Pattern recognition receptor* »). Ces derniers incluant les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, TLR) sont activés lors d'une réponse immunitaire innée par des motifs moléculaires associés aux dommages ou aux agents pathogènes, respectivement DAMP (« *Damage Associated Molecular Pattern* ») et PAMP (« *Pathogene Associated Molecular Pattern* »). L'induction de la voie NF- κ B *via* les TLR constitue le 1^{er} signal permettant la transcription de plusieurs gènes et l'expression des composants de l'inflammasome NLRP3, la pro-interleukine-1 bêta (pro-IL-1 β) et la pro-interleukine-18 (pro-IL-18). L'activation de P2RX7 constituant le second signal (signal d'activation) permet : (1) un efflux de K⁺, (2) l'assemblage de l'inflammasome qui est un complexe multiprotéique comprenant les protéines NLRP3, une protéine adaptatrice ASC et la procaspase-1 et (3) l'activation de l'inflammasome NLRP3 pour la conversion de la procaspase-1 en caspase-1 qui entraîne la maturation des pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leur forme mature (IL-1 β et IL-18) et leur sécrétion (Di Virgilio *et al.* 2017) (**Figure 15**). Des études pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 β , suggèrent que l'efflux de K⁺ agirait comme un signal commun d'activation (Muñoz-Planillo *et al.* 2013). D'autres paramètres peuvent également jouer un rôle dans cette activation comme l'osmolarité extracellulaire et le volume cellulaire (Compan *et al.* 2012).

L'activation de P2RX7 permet aussi la formation de ROS notamment dans les macrophages (Lenertz *et al.* 2009) et la microglie (Bartlett *et al.* 2013), les cellules de la glande sous-maxillaire (Seil *et al.* 2008) et les cellules érythroïdes (Wang and Sluyter 2013). Cette augmentation de ROS provoquerait également l'activation de l'inflammasome NLRP3 de façon indirecte en modulant la concentration en K⁺ intracellulaire et la sécrétion d'IL-1 β (Gross *et al.* 2011), bien que cela reste controversé par d'autres études (Muñoz-Planillo *et al.* 2013). En plus des ROS, l'activation de P2RX7 permet la formation d'espèces réactives de l'azote et de phagolysosomes (Di Virgilio 2013), ainsi que l'induction et la libération de : protéases, caspases, métalloprotéases et autres enzymes comme les cathepsines

(Ferrari *et al.* 1999). Ces dernières peuvent entraîner une multitude de changements liés à la membrane et de ce fait, conduire à la perte ou la libération des molécules de surface (Wiley *et al.* 2011) telles que la chimiokine CXCL16 (Pupovac *et al.* 2013), la molécule d'adhésion CD44 (Lin *et al.* 2012), la protéine précurseur de l'amyloïde soluble (*amyloid precursor protein*, APP) (Delarasse *et al.* 2011), récepteur de l'IL-6 (Garbers *et al.* 2011), le CD62L (L-sélectine) (Elliot *et al.* 2005), le CD23 (le récepteur de l'IgE de faible affinité) (Pupovac *et al.* 2015), le CD27 (Moon *et al.* 2006), le récepteur du complément de type 2 (CR2 ou CD21) (Sengstake *et al.* 2006) et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM1) (Mishra *et al.* 2016). Ces événements sont principalement médiés par des métalloprotéases dont deux en particulier : ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain-containing protein*) 10 et ADAM 17 (Garbers *et al.* 2011).

P2RX7 permet l'activation de la transcription *via* des facteurs de transcriptions (FT) notamment le NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et le NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), et peut donc réguler l'expression des gènes en réponse à l'ATP, afin de reprogrammer le métabolisme cellulaire en période de stress ou lors de la réponse inflammatoire. L'activation de P2RX7 joue également un rôle dans la modulation des concentrations de glutamate extra synaptiques et/ou synaptiques : il pourrait donc jouer un rôle dans la neurotransmission et dans des changements de neuroplasticité ou de comportement. L'activation de P2RX7 permet la libération d'une acyltransférase transamidante appelée transglutininase-2 (TG2) et de la Thioredoxin-1 (Trx) qui active la TG2 (Adamczyk *et al.* 2015). La TG2 est impliquée dans divers événements physiologiques, l'adhésion, l'endocytose, l'apoptose, mais pourrait modifier les peptides immunogènes pour favoriser l'activation et le *homing* des lyT et B, contribuant ainsi à plusieurs maladies auto-immunes, telles que l'arthrite inflammatoire (Aeschlimann and Knäuper. 2017).

En outre, l'une des fonctions majeures de P2RX7 est sa capacité à induire l'apoptose *via* l'exposition de phosphatidylsérine (PS) (Zanovello *et al.* 1990 ; Mackenzie *et al.* 2005). En effet, son activation sur les lyT entraîne une modification du volume cellulaire et de la composition de la membrane plasmique avec une exposition précoce de PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique (liée à l'influx d'ions Ca²⁺ et Na⁺) (Taylor *et al.* 2008 ; Adriouch *et al.* 2001). Une activation prolongée conduit ensuite à la mort des lyT, associée à une perte de l'intégrité de la membrane qui peut être visualisée *via* l'entrée de molécules liant l'ADN telles que l'iodure de propidium ou le DAPI. L'exposition des PS après stimulation par l'ATP est réversible, s'il (l'ATP) est éliminé durant les trente premières minutes de l'exposition (Mackenzie *et al.* 2005). Alors que l'exposition des PS par l'ADP-ribosylation de P2RX7 est quant à elle irréversible (Scheuplein *et al.* 2009). En plus de cette capacité de délocalisation des PS, P2RX7 permet aussi la libération de cytochrome C, le bourgeonnement membranaire, le clivage des

caspase 3, 8 et 9 typiques de l'apoptose (Ferrari *et al.* 1997 ; Mackenzie *et al.* 2005), ainsi que l'activation de la caspase 1 comme expliqué précédemment, qui permet le clivage de la Gasdermin D (GSDM-D) et qui conduit à l'induction d'une forme rapide et pro-inflammatoire de mort cellulaire appelée « pyroptose » dans les cellules myéloïdes (Piccini *et al.* 2008).

Bien qu'historiquement P2RX7 soit connu pour sa capacité à induire l'apoptose, il semble également être impliqué dans la prolifération cellulaire. Ainsi, des données suggèrent que P2RX7 serait plus impliqué dans la prolifération cellulaire que la mort cellulaire dans certains types cellulaires notamment dans les lyT et la microglie. Cela est peut-être dû à une expression d'un variant en particulier. La libération autocrine d'ATP par les lyT lors de leur activation entraîne l'activation de P2RX7 et augmente la sécrétion d'IL-2 (facteur de croissance des lyT) *via* la stimulation du facteur nucléaire NFAT (Yip *et al.* 2009). Des lignées cellulaires exprimant P2RX7 peuvent proliférer, même en absence de sérum. La prolifération est abolie dans les lignées exprimant un variant tronqué (Adinolfi *et al.* 2005). De même, dans la microglie, le blocage de P2RX7 ou la surexpression d'un mutant abolissant l'activité du pore réduit la prolifération (Bianco *et al.* 2006 ; Monif *et al.* 2009).

Un autre processus de signalisation cellulaire associé à P2RX7 est la régulation de la phagocytose (Wiley and Gu 2012). La transfection de cellules non phagocytaires (HEK) avec de l'ADN codant pour P2RX7 confère alors aux cellules la capacité de phagocyter (Gu *et al.* 2010). P2RX7 agirait comme un récepteur charognard (*scavenger receptor*) (Gu *et al.* 2011 ; Gu *et al.* 2012). La stimulation de P2RX7 par l'ATP inhibe cette voie phagocytaire (Gu *et al.* 2010), suggérant que cette fonction ne passe pas par les voies classiques (canal ionique et pore) de P2RX7, mais par une nouvelle voie qui serait en lien avec le cytosquelette (Gu *et al.* 2009 ; Gu *et al.* 2010).

P2RX7 agit donc dans différentes voies de signalisation (sécrétion de cytokines, de protéases, prolifération et/ou mort cellulaire, ROS,...). Ces voies de signalisation sont spécifiques de chaque type cellulaire ayant des effecteurs en aval différents. Sachant que P2RX7 est un régulateur clé de la réponse immunitaire, un déséquilibre dans son activation peut favoriser plusieurs conditions pathologiques liées au système immunitaire (maladies inflammatoires et/ou auto-immunes) ou des troubles du système nerveux, notamment des troubles neurodégénératifs.

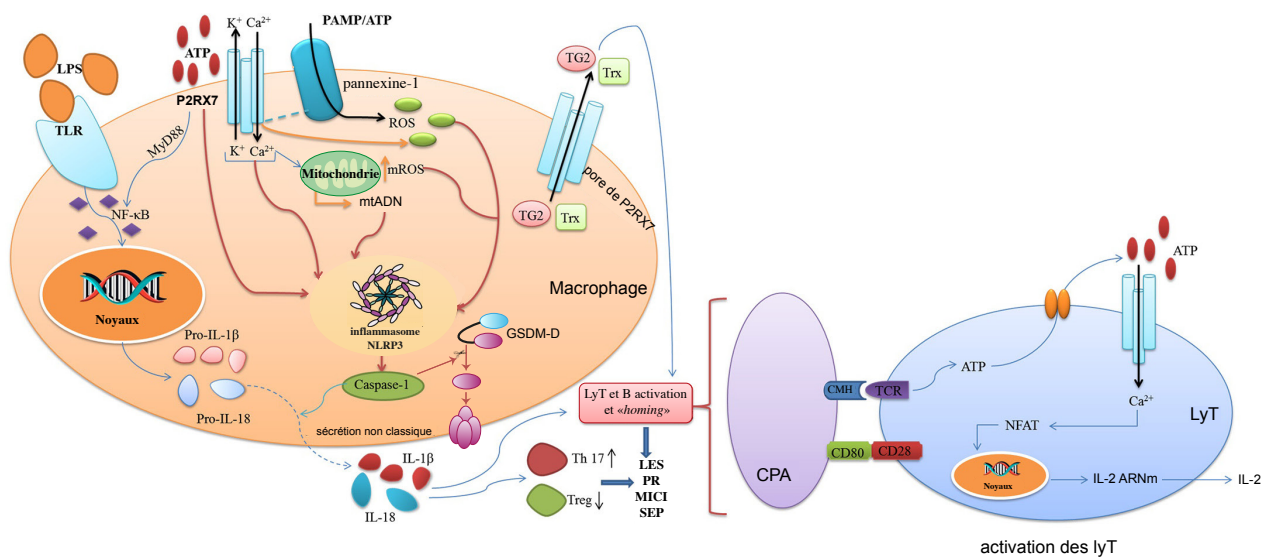


Figure 15 : Voies de signalisation de P2RX7 et mécanismes d'action. Activé par l'ATP, le P2RX7 facilite l'ouverture des canaux ou la formation de pores entraînant un efflux de K^+ , un afflux de Ca^{2+} ou un flux supplémentaire d'autres molécules telles que l'ATP via le recrutement d'hémicanaux membranaires comme la pannexine-1. P2RX7 induit différentes voies de signalisations. L'activation de l'inflammasome NLRP3 passe par 2 signaux : le signal 1 permet l'amorçage ou le « priming » de l'inflammasome par un stress cellulaire lié à une infection bactérienne, virale ou fongique ou par des DAMPs endogènes activant les PRR. Cela conduit à l'activation de la voie NF- κ B permettant la transcription des gènes clés dans la cascade inflammatoire codant pour notamment les composants pro-IL-1 β , pro-IL-18, les protéines NLRP3 et les caspases proinflammatoires. Le signal 2 permet l'activation de l'inflammasome par l'oligomérisation de NLRP3 et entraîne la conversion de la pro-caspase-1 en caspase-1 mature, la libération de cytokines pro-inflammatoires et le clivage de la GSDMD (qui conduit à la mort cellulaire lytique inflammatoire, la pyroptose). Ce signal passe par : (1) une diminution du K^+ cytosolique et une augmentation du Ca^{2+} cytosolique, (2) la production de ROS induite par l'activation de P2RX7, (3) les modifications de l'homéostasie ionique, en particulier le Ca^{2+} , qui provoquent des dommages mitochondriaux illustrés par la libération d'ADN mitochondriale (ADNmt) dans le cytosol, une production accrue de ROS mitochondriales (mROS) et une perte du potentiel membranaire. L'ADNmt et le mROS contribuent à l'activation de l'inflammasome et (4) l'activation de NLRP3 via une interaction mutuelle directe. P2RX7 médie l'externalisation de TG2 en conjonction avec Trx via la formation des pores du P2RX7. L'activation du TCR entraîne une libération l'ATP activant P2RX7 (à droite) qui participe à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T en déclenchant l'influx de Ca^{2+} , nécessaire à l'activation de la voie NFAT et conduisant à l'expression de l'IL-2. De plus, P2RX7 notamment via la production de cytokines pro-inflammatoire (IL-1 β et IL-18) module l'équilibre entre les cellules auxiliaires T 17 (Th17) et régulatrices T (Treg), son activation altère l'activité suppressive et la stabilité des cellules Treg et inhibe la différenciation des LyT CD4 + naïves en Treg, et favorise la conversion des lymphocytes Treg en lymphocytes Th17 ainsi que l'augmentation de la production d'anticorps par amplification des lymphocytes B. Ce déséquilibre entre les LyTh17 et les Treg favorise les LyTh17 pro-inflammatoires rapporté comme étant impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes, notamment le LES, la PR, les MICI et la SEP. PRR : récepteur de reconnaissance de motif ; TLR : Récepteur de type Toll ; NF- κ B : facteur nucléaire kappa B ; MAPK : protéine kinase activée par un mitogène ; ATP : adénosine triphosphate ; PAMP : modèles moléculaires associés aux agents pathogènes ; NLRP3 : Famille des récepteurs de type NOD (domaine de liaison aux nucléotides), domaine pyrine contenant 3 NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; ADNmt : ADN mitochondrial ; mROS : ROS mitochondriales ; TG2 : transglutaminase-2 ; Trx : thiorédoxine-1 ;

TCR : récepteur des lymphocytes T ; NFAT : facteur nucléaire des lymphocytes T activés ; IL-2 : interleukine-2 ; CPA : cellules présentatrices d'antigènes ; LES : lupus érythémateux disséminés ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales ; SEP : sclérose en plaques. D'après Cao et al. 2019.

2.3.2 Rôle dans l'inflammation

Depuis la découverte de P2RX7, en particulier lors des trois dernières décennies, la signalisation du récepteur P2RX7 est devenue une voie très étudiée dans les maladies infectieuses et inflammatoires, car étant largement exprimé par les différentes cellules du système immunitaire (SI), il possède plusieurs fonctions dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (cf. 2.2.2 Distribution cellulaire). Lors d'une réponse immunitaire, l'activation de P2RX7 permet, comme détaillé précédemment, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération de cytokines pro-inflammatoire associées (IL-1 β et IL-18). Il favorise également la libération d'IL-6 *via* une voie dépendante du Ca²⁺ (Shieh *et al.* 2014), la production de radicaux libres (Cruz *et al.* 2007 ; Hewinson and Mackenzie 2007), l'activation des caspases et des phospholipases (Coutinho-Silva *et al.* 2003b ; Kahlenberg *et al.* 2005 ; Costa-Junior *et al.* 2011) et la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Coutinho-Silva *et al.* 1999 ; Bianco *et al.* 2006). Par ailleurs, il module également les voies de signalisations intracellulaires telles que MyD88/NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR et l'activation des protéines de la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) (MEK, ERK-1/2) (Bradford and Soltoff 2002 ; Liu *et al.* 2011 ; Bian *et al.* 2013) qui ont toutes des rôles dans la réponse immunitaire innée. Il a également été reporté que P2RX7 pouvait induire la production de prostaglandines qui jouent un rôle dans la biosynthèse de PGE₂, un acteur important de l'inflammation responsable du syndrome du malade (illustré par la fièvre et la douleur) (Barberà-Cremades *et al.* 2012 ; Bartlett *et al.* 2014).

Pendant la réponse immunitaire adaptative, P2RX7 est directement impliqué dans l'activation des lyT. En effet, P2RX7 est nécessaire pour l'influx de calcium médié par le TCR et la production d'IL-2, sans cela l'activation des lyT est bloquée (Yip *et al.* 2009). De plus, P2RX7 joue un rôle dans la polarisation des lyT notamment dans la modulation de l'équilibre entre les lyTh17 et les Tregs (Schenk *et al.* 2011). En effet, l'activation de P2RX7 diminuerait la viabilité et l'activité immunosuppressive des Tregs et au contraire favoriserait la polarisation en lyTh17, alors qu'à l'inverse son blocage favoriserait la conversion de lyT CD4+ en Tregs (Schenk *et al.* 2011).

2.3.2.2 P2RX7 et les maladies inflammatoires et/ou auto-immunes

Au vu des actions décrites de P2RX7 au niveau du système immunitaire, il peut donc exercer des rôles et des fonctions importantes dans le cadre de pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes. L'hypothèse principale est que le blocage de son action pourrait présenter une nouvelle stratégie

thérapeutique. Les enjeux ici sont donc d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de P2RX7 impliqués dans ces pathologies et de développer des inhibiteurs plus spécifiques de P2RX7, qui pourraient servir en tant que nouvelles options thérapeutiques. Il sera question tout d'abord des quelques exemples de pathologies ne touchant pas le SNC.

Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent 2 types de maladies : la maladie de Crohn et les colites ulcéraives hémorragiques. P2RX7 est exprimé dans différents compartiments intestinaux (*cf.* 2.2.2 Distribution cellulaire ; Campos *et al.* 2012) et est surexprimé dans le colon de patients atteints de la maladie de Crohn, une maladie auto-immune (Neves *et al.* 2014). Différents modèles murins sont disponibles où il a été montré un intérêt du blocage de P2RX7 (Burnstock 2016 ; Longhi *et al.* 2017). Parmi ces modèles, on peut notamment noter le modèle de colite induite par TNBS (*Trinitrobenzenesulfonic acid*) qui mime la maladie de Crohn, le modèle de colite induite par dextran sulfate sodium (DSS) pour les maladies de colites hémorragiques et le modèle de cancer associé aux colites (CAC, *colitis associated colorectal cancer*) qui correspond à l'effet délétère le plus important chez l'Homme. Grâce à ces modèles animaux, il a été montré que P2RX7 induisait la mort des neurones entériques et une inflammation intestinale *via* l'activation de mastocytes, conduisant à des troubles de la motilité intestinale (Gulbransen *et al.* 2012 ; Kurashima *et al.* 2012 ; Antonioli *et al.* 2014 ; Matsukawa *et al.* 2016). L'inhibition pharmacologique ou génétique de P2RX7 dans ces modèles inflammatoires de l'intestin (TNBS, DSS) ou le modèle de colite associée au cancer (CAC) améliore la pathologie (Wan *et al.* 2016 ; Marques *et al.* 2014 ; Hofman *et al.* 2015 ; Figliuolo *et al.* 2017 ; Neves *et al.* 2014).

Ces modèles de MICI comme le modèle TNBS induisent une dysbiose et une perméabilisation de l'épithélium intestinal conduisant à une infiltration de bactéries pathogènes, présentes dans le microbiote intestinal. Ces bactéries entraînent une libération d'ATP, soit par un mécanisme actif *via* l'activation des TLR, soit de manière passive lors de la destruction tissulaire entraînant une augmentation de l'expression et de l'activation de P2RX7. Cela entraîne la mort cellulaire des Tregs, diminuant ainsi la production de cytokines anti-inflammatoires dans la *lamina propria* et expliquant l'effet délétère de P2RX7 dans ce contexte (Figliuolo *et al.* 2017). De plus, une étude sur les modèles CAC a montré qu'une inhibition de P2RX7 permet de diminuer l'inflammation, mais augmente le développement tumoral. En effet, comme attendu, le blocage de P2RX7 conduisait bien à une augmentation de la production de facteurs anti-inflammatoires tels que TGF- β et du recrutement des Tregs au niveau du site inflammatoire. Ces événements contribuent à une immunorégulation importante en défaveur de la colite induite chez les souris CAC, mais en faveur du cancer de l'intestin

illustré par une accélération de la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Hofman *et al.* 2015). Un essai clinique sur l'évaluation de l'effet de l'inhibition de P2RX7 par ingestion d'inhibiteur chimique (AZD9056) a montré un effet bénéfique dans l'inflammation et un soulagement de la douleur chez des patients atteints de la maladie de Crohn (Eser *et al.* 2015). Ces résultats montrent bien l'implication de P2RX7 dans les mécanismes impliqués dans les pathologies inflammatoires de l'intestin.

Dans les maladies rénales

La signalisation purinergique exerce des effets physiologiques cruciaux sur la fonction rénale, contrôlant la contractilité vasculaire et la fonction tubulaire (Menzies *et al.* 2017). Il a été démontré que P2RX7 joue un rôle important dans les réactions inflammatoires observées dans les maladies rénales et contribue aux lésions rénales glomérulaires, tubulaires et vasculaires (Savio *et al.* 2018), participant ainsi à la production excessive de collagène interstitiel responsable de la fibrose rénale (Koo *et al.* 2017). Par rapport aux conditions physiologiques, l'expression de P2RX7 est fortement augmentée après une blessure dans les cellules rénales (podocytes, cellules endothéliales, mésangiales et épithéliales tubulaires) (Burnstock *et al.* 2014 ; Franco *et al.* 2015), mais aussi dans les cellules immunitaires infiltrantes (macrophages, DC et lyT) (Deplano *et al.* 2013 ; Koo *et al.* 2017). L'activation de P2RX7 favorise l'inflammation *via* la voie de l'inflammasome NLRP3 et la libération de cytokines inflammatoires dans plusieurs modèles expérimentaux de pathologies rénales telles que la glomérulonéphrite (Deplano *et al.* 2013), la néphropathie diabétique (Solini *et al.* 2013), la néphrite tubulo-interstitielle (Gonçalves *et al.* 2006), la néphropathie hypertensive (Franco *et al.* 2015), la lésion rénale aiguë (Koo *et al.* 2017) et la lésion rénale chronique (Granata *et al.* 2015). Le blocage pharmaceutique ou génétique de P2RX7 dans ces modèles expérimentaux de lésions rénales confère donc un effet protecteur (Gonçalves *et al.* 2006 ; Deplano *et al.* 2013 ; Solini *et al.* 2013 ; Koo *et al.* 2017 ; Taylor *et al.* 2009).

Dans les maladies auto-immunes

P2RX7 a été rapporté comme étant impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes dont le lupus érythémateux systémique (LES) (Yang and Chiang 2015), la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Zeng *et al.* 2019), le syndrome de Sjögren (Lester *et al.* 2013), le psoriasis (Killeen *et al.* 2013) et la sclérodermie systémique (Gentile *et al.* 2017). Le blocage de P2RX7 dans des modèles expérimentaux de maladies auto-immunes a permis d'obtenir des résultats intéressants vers une amélioration des pathologies. Je vais ici insister sur les deux exemples de maladies auto-immunes, les plus définis et dont on connaît le mieux le rôle de P2RX7 : le LES et la PR.

Basiquement, la PR est une maladie-auto-immune caractérisée par des autoanticorps contre la membrane synoviale des articulations. Les cellules immunitaires notamment les lymphocytes Th17 envahissent la membrane synoviale. L'inflammation présente au niveau de la membrane synoviale (appelée arthrite) entraîne son épaissement et une production excessive de liquide synovial qui s'accumule dans l'articulation, conduisant progressivement à la déformation et à la destruction des articulations et des structures voisines (os, ligaments). Chez des souris déficientes en P2RX7, l'induction d'arthrite par injection d'anticorps anti-collagène et de LPS (lipopolysaccharide, afin de stimuler l'immunité innée *via* le TLR4) a montré une réduction de l'incidence et de la gravité de l'arthrite accompagnée d'une amélioration des lésions articulaires et des produits de dégradation du collagène (Labasi *et al.* 2002). De même, l'inhibition de P2RX7 a également amélioré l'inflammation et la progression de l'arthrite notamment en diminuant la production d'IL-17 et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-18 et l'IL-1 β , dans deux modèles de PR, les plus utilisés (Fan *et al.* 2016) : un modèle dit CIA (*collagen induced arthritis*) et un modèle SCWIS (*Streptococcal cell wall induced arthritis*). Dans le modèle de CIA, l'arthrite est induite par injection de collagène bovin de type II (CII) avec du CFA. Le modèle SCWIS consiste en l'induction de l'arthrite par SCW (*Streptococcal cell wall*) en injectant des polymères de peptidoglycane-polysaccharide issus de la paroi cellulaire streptococcique. De plus, l'administration d'oATP, un inhibiteur de P2RX7, dans les pattes enflammées d'un modèle murin induit par le CFA a permis de soulager la douleur inflammatoire (Dell'Antonio *et al.* 2002). Pour comprendre les mécanismes impliqués, des études *in vitro* utilisant une lignée cellulaire MH7A (cellules synoviales PR) ont été menées et ont montré que l'inactivation de P2RX7 : conduisait à une réduction de la production d'IL-1 β et d'IL-6 (Chen *et al.* 2018) et jouait sur deux voies indépendantes des cytokines dans la PR à savoir la voie P2RX7-Transglutaminase 2 (TG2) et la voie P2RX7-cathepsine. L'inhibition de P2RX7 bloque ainsi la libération aiguë d'une grande quantité de TG2 par les macrophages, sans effets au niveau des enzymes apparentées à la surface cellulaire (Adamczyk *et al.* 2015) et la libération de cathepsines par les macrophages induits par l'ATP (Lopez-Castejon *et al.* 2010).

L'inhibition de P2RX7 semble donc être une bonne stratégie pour réduire l'inflammation dans ces pathologies inflammatoires et/ou *auto-immunes* chroniques. Cependant, ces effets bénéfiques restent à être confirmés chez l'Homme.

2.3.3 Rôle dans le système nerveux

P2RX7, en plus d'être exprimé par les cellules du système immunitaire, est aussi fortement exprimé par les cellules du système nerveux (*cf* 2.2.2 Distribution tissulaire et cellulaire), jouant un rôle dans la physiologie et également dans la pathophysiologie de maladies neurodégénératives. Je vais donc

parler des rôles de P2RX7 dans le SNC et son implication potentielle dans les maladies neurodégénératives.

2.3.3.1 Rôle dans la physiologie du SNC

L'ATP peut jouer un rôle en tant que neurotransmetteur dans des conditions physiologiques ou de signal de danger lorsqu'elle est libérée en grande quantité par les cellules endommagées ou par les cellules gliales activées. L'activation de P2RX7 par l'ATP conduit à l'activation de différentes voies biochimiques selon l'environnement physiologique ou pathologique et peut ainsi jouer un rôle double (néfaste ou bénéfique) sur le système nerveux. Les fonctions de P2RX7 dans l'inflammation et la mort cellulaire ont été largement étudiées et décrites précédemment. Dans le SNC, l'implication de P2RX7 dans la mort cellulaire a donc été montrée et établie notamment au niveau des cellules gliales, mais son rôle au niveau de la mort neuronale reste encore à être éclaircie puisque l'expression de P2RX7 dans les neurones fait toujours débats (*cf.* 2.2.2. Distribution cellulaire).

Les cellules neurales progénitrices (CNP) constituent une population hétérogène capable de se régénérer et de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Chez les rongeurs adultes, ils sont présents dans 2 régions du SNC (la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux et dans le gyrus denté). Des études de patch-clamp sur culture primaire ont montré que les CNP expriment un P2RX7 fonctionnel (Delarasse *et al.* 2009 ; Messemer *et al.* 2013). Chez des souris adultes, l'action de P2RX7 dans les CNP dépend aussi de la quantité d'ATP présente. P2RX7 joue un rôle dans la phagocytose en absence d'ATP. En présence de faibles concentrations d'ATP, les CNP adultes sont à l'état de repos : l'activation de P2RX7 induit l'influx de calcium et une diminution de la prolifération (Leeson *et al.* 2018). La stimulation de P2RX7 dans les CNP en réponse à une quantité élevée d'ATP, induit l'activation de la caspase 3 (pro-apoptotique) et la formation de pores conduisant à la mort cellulaire (Messemer *et al.* 2013). P2RX7 peut donc être impliqué dans la régulation de la population de CNP *via* la phagocytose des cellules mortes et la prolifération des CNP. Dans les CNP humain et les neuroblastes, il a été montré qu'en absence de sérum, P2RX7 participerait à la clairance des cellules neuronales apoptotiques comme récepteur scavenger, un rôle important dans la neurogenèse (Lovelace *et al.* 2015).

La microglie est la cellule immunitaire résidente du SNC. Elle partage de nombreuses fonctions avec les macrophages comme la phagocytose, la libération de cytokines pro-inflammatoires et la production de ROS et d'oxyde nitrique. L'activation de P2RX7 sur la microglie entraîne l'induction de la microglie, sa prolifération et les mêmes événements que chez les macrophages comme la stimulation de

l'inflammasome NLRP3, la libération de $TNF\alpha$, la production de ROS qui stimule la voie $NF\kappa B$ et la libération de médiateurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, pouvant provoquer la mort des neurones voisins (Bianco *et al.* 2006 ; Monif *et al.* 2009 ; Parvathenani *et al.* 2003). L'utilisation de petits ARN interférents (ARNsi) pour diminuer l'expression de P2RX7 dans la microglie primaire de rat, entraîne une baisse de leur prolifération cellulaire (Bianco *et al.* 2006). Alors que la surexpression de P2RX7 dans la microglie issue de cultures mixtes de neurones et de cellules gliales de rat, conduit à une augmentation du nombre de cellules microgliales (Monif *et al.* 2009). On observe donc dans ces deux modèles *in vitro* une prolifération de la microglie dépendante de P2RX7 sans ajout d'ATP supplémentaire, montrant que la quantité d'ATP produite par les cellules voisines est suffisante pour induire la prolifération en condition de repos (Bianco *et al.* 2006 ; Monif *et al.* 2009). Cet effet de P2RX7 semble provenir de sa capacité à former des pores non sélectifs, car la transfection de la microglie avec un P2RX7 mutant (ayant une fonction défectueuse dans la formation du pore (P2RX7 G345Y)) abolit l'effet prolifératif (Monif *et al.* 2009). Le rôle de P2RX7 dans la prolifération microgliale est aussi observé dans la moelle épinière embryonnaire de souris (Rigato *et al.* 2012). En revanche, dans le cortex de souris nouveau-nées, une stimulation prolongée de P2RX7 par de fortes doses de Bz-ATP entraîne une mort cellulaire *via* la déphosphorylation d'Akt et ERK (He *et al.* 2017). Ainsi, en présence de quantités physiologiques d'ATP, P2RX7 peut contrôler la prolifération de la microglie dans le SNC, tandis qu'une activation soutenue peut induire la mort cellulaire. Skaper *et al.* (2006) ont testé l'impact de la stimulation de P2RX7 de la microglie sur les neurones voisins grâce à des co-cultures de neurones corticaux et de la microglie corticale de rat en présence d'ATP (ou Bz-ATP). Cela induisait la mort des neurones par la libération de superoxydes et d'oxydes nitriques par la microglie en réponse à l'activation du P2RX7 et ne nécessitait pas de contact direct microglie-neurone.

2.3.3.2 Rôle dans les maladies neurodégénératives

De nombreuses études rapportent un rôle important des récepteurs P2 et notamment P2RX7 dans des troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la SEP, mais également dans l'épilepsie ou dans des troubles neuropsychiatriques (par exemple la dépression). Ces troubles neurodégénératifs sont caractérisés par un dysfonctionnement progressif du système nerveux qui entraîne une inflammation, une gliose et une neurodégénérescence du SNC (Kanellopoulos and Delarasse 2019). La neuro-inflammation est la caractéristique néfaste commune entre les différentes pathologies neurodégénératives et P2RX7 peut intervenir dans ces processus neuro-inflammatoires. Dans des conditions physiologiques, P2RX7 présente une faible expression dans les cellules du SNC. Mais dans des conditions de stress où l'ATP est libérée, l'expression de P2RX7 est alors augmentée. Ce fait a été retrouvé dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la MA

(astrocytes et microglie dans les zones à forte densité de plaques amyloïdes) (McLarnon *et al.* 2006 ; Martin *et al.* 2019 ; Parvathenani *et al.* 2003), dans la SLA (microglie) (Yiangou *et al.* 2006) et dans l'épilepsie (néocortex et hippocampe) (Barros-Barbosa *et al.* 2016 ; Jimenez-Pacheco *et al.* 2016).

Dans la maladie d'Alzheimer

La MA est une forme progressive de démence caractérisée par une perte neuronale croissante notamment dans le cortex et l'hippocampe. La pathogénie de la MA est complexe et n'a pas encore été complètement élucidée. Elle implique l'accumulation d'agrégats de protéines insolubles dans le SNC qui sont composés de plaques amyloïdes β ($A\beta$) produites par le clivage de la protéine précurseur amyloïde (APP) et d'enchevêtrements neurofibrillaires composés de protéines Tau phosphorylées (Polanco *et al.* 2018). Des données récentes ont permis de mettre en évidence l'intérêt de P2RX7 en tant qu'acteur possible dans cette physiopathologie (Martin *et al.* 2019). Dans la MA, l'expression de P2RX7 est augmentée chez les patients MA (dans le cerveau et la microglie activée) (McLarnon *et al.* 2006) et dans des modèles de rongeurs : l'hippocampe d'un modèle murin de MA et dans le cerveau de rat après injection d' $A\beta$ (Parvathenani *et al.* 2003,). Les peptides $A\beta$ entraînent la production d'ATP par la microglie en passant par des mécanismes dépendant de P2RX7. En effet, les peptides $A\beta$ sont incapables d'induire la production d'ATP si les cellules microgliales n'expriment pas P2RX7 (Sanz *et al.* 2009). Cette production d'ATP augmente l'activation de la microglie de manière autocrine et paracrine contribuant à la mort neuronale (Kim *et al.* 2007 ; Sanz *et al.* 2009). Sachant que l'ATP a un pouvoir chimioattractant, ses fortes concentrations autour des plaques $A\beta$ contribuent probablement à la forte densité de la microglie activée autour de ces dernières (Sanz *et al.* 2009). Au contraire, le blocage de P2RX7 favorise le phénotype de type anti-inflammatoire de la microglie, en stoppant l'activation de la microglie par les peptides $A\beta$ (Sanz *et al.* 2009) et en améliorant la phagocytose et la clairance des peptides $A\beta$ par la microglie (Ni *et al.* 2013). De plus, l'utilisation d'un antagoniste de P2RX7 (BBG), dans un modèle murin de MA, entraîne une réduction des plaques $A\beta$, améliore la plasticité synaptique et réduit les déficits cognitifs (Chen *et al.* 2014).

Dans la maladie de Parkinson

La MP est une dégénérescence progressive des neurones à dopamines au niveau cérébrale et est dû à l'accumulation de protéines toxiques (appelées corps de Lewy). La dopamine est un neurotransmetteur important dans de nombreuses fonctions comme les mouvements volontaires et la cognition. Une étude a montré que l'activation de l'inflammasome P2RX7/NLRP3 était liée au développement de la MP (Solini *et al.* 2021). La stimulation de P2RX7 a été détectée sur la microglie de cerveau de patients atteints de MP (Durrenberger *et al.* 2012 ; Jiang *et al.* 2015). En outre, les

déficits moteurs et de la mémoire induits dans un modèle de MP, par injection de 6-OHDA, un neurotoxique des neurones dopaminergiques, ont été améliorés par l'administration d'un antagoniste de P2RX7 (BBG) (Carmo *et al.* 2014 ; Ferrazoli *et al.* 2017 ; Kumar *et al.* 2017). Cependant, un autre antagoniste de P2RX7 (A-438079) empêche la perte des niveaux de dopamine, mais n'a pas empêché la perte de cellules dopaminergiques dans ce même modèle (Marcellino *et al.* 2010). En parallèle, l'inhibition et/ou la délétion génétique de P2RX7 n'ont pas été associées aux processus de neuroprotection dans un autre modèle murin de MP, utilisant l'injection de neurotoxines MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridin) (Hracsó *et al.* 2011). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour clarifier davantage la relation entre l'activation de P2RX7 et la MP.

Dans les pathologies neuropsychiatriques

La neuro-inflammation induite par l'activation de P2RX7 *via* l'inflammasome NLRP3 contribue à des troubles neuropsychiatriques notamment la dépression. C'est peut-être le champ d'application, le plus prometteur des médicaments ciblant le P2RX7 jusqu'à présent. L'effet bénéfique de l'inhibition de P2RX7 dans des modèles animaux de neuro-inflammation et d'anhédonie (perte de la capacité à ressentir le plaisir), ouvre la voie à son application clinique dans le traitement de la dépression (Bhattacharya and Jones 2018 ; Franklin *et al.* 2018). L'antagoniste de P2X7 « JNJ-54175446 » fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2, pour traiter les troubles dépressifs (clinicaltrial.gov, NCT04116606). L'inhibition de P2RX7 pourrait également être bénéfique dans d'autres pathologies du système nerveux tels que l'autisme (Horváth *et al.* 2019) et l'épilepsie (Beamer *et al.* 2017). Des études ont également démontré le rôle crucial de P2RX7 dans la douleur neuropathique (Inoue and Tsuda 2021) et que son inhibition atténue cette douleur neuropathique dans diverses pathologies (Zhang *et al.* 2020).

2.3.3.3 Rôle dans la SEP

Comme cela a été dit précédemment, la SEP touche le système immunitaire et le SNC. Je vais ici aborder l'impact de P2RX7 dans ces deux grands systèmes dans le cadre de la SEP.

La rupture de l'homéostasie observée dans la phase précoce de la SEP entraîne une augmentation de la concentration d'ATP et de l'expression de P2RX7. Cela est également retrouvé chez les patients atteints de SEP, notamment dans la microglie (Yiangou *et al.* 2006 ; Beaino *et al.* 2017), dans les astrocytes (Narcisse *et al.* 2005 ; Amadio *et al.* 2017), dans les oligodendrocytes et dans le nerf optique (Matute *et al.* 2007). Une boucle de rétroaction positive de P2RX7 se met alors en place : P2RX7 libère des facteurs amplifiant son activation et entraînant une exacerbation de l'inflammation, notamment *via* l'activation microgliale, un recrutement des cellules immunitaires et des réponses auto-immunes qui aggravent la neurodégénérescence. Cet état pro-inflammatoire survient aux stades précoces de la

maladie et est un facteur clé conduisant à la démyélinisation et à la mort neuronale. Comme expliqué précédemment, P2RX7 médie plusieurs processus pouvant contribuer à l'exacerbation de la neuro-inflammation à savoir une libération accrue d'ATP, une activation et une prolifération de la microglie et une libération de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β (principalement par l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et par la maturation/sécrétion de cytokines), le TNF- α et d'autres cytokines et chimiokines. Ces facteurs à leur tour déclencheront des réponses pro-inflammatoires. Par ailleurs, P2RX7 module également l'activation, la différenciation et la fonction des monocytes/macrophages et des lymphocytes T. De plus, chez les patients atteints de SEP-SP, la proportion de monocytes infiltrés exprimant P2RX7 est augmentée dans les vaisseaux sanguins du cortex frontal. Dans cette zone du cortex frontal, on observe une expression accrue de la chimiokine MCP-1 (qui attire les leucocytes) colocalisée avec P2RX7 exprimé par les astrocytes (Amadio *et al.* 2017). Des études *in vitro* sur des astrocytes de rat en culture ont montré que l'activation de P2RX7 par le Bz-ATP augmentait l'expression de MCP-1 (Panenka *et al.* 2001). Or, au contraire, son expression est diminuée dans les monocytes présents dans le sang des patients (Amadio *et al.* 2017). À la suite de ces travaux, Amadio *et al.* (2017) ont émis l'hypothèse que l'augmentation de l'ATPe dans le SNC observée dans les stades initiaux de la SEP, entraîne une augmentation de l'expression de P2RX7 et de MCP-1 par les astrocytes. Cela favorise le chimiotaxisme des monocytes périphériques qui régulent à la baisse leur expression de P2RX7 afin de garantir leur invasion et leur survie dans le SNC, contribuant aux effets néfastes de la neuro-inflammation. Dans le modèle EAE, cette augmentation de l'expression de P2RX7 dans les cellules du SNC est aussi observée durant la phase aiguë de l'EAE (Grygorowicz *et al.* 2016), notamment sur les cellules de l'astroglie avant même l'apparition des symptômes cliniques (Grygorowicz *et al.* 2010). L'activation du P2RX7 dépendant de l'ATP provoque : (1) une excitotoxicité des oligodendrocytes, (2) des dommages neuronaux ressemblant à ceux que l'on peut retrouver dans la SEP, notamment une démyélinisation et une altération axonale, (3) une diminution du nombre de péricytes vasculaires et d'une baisse des niveaux de claudine-5, ainsi que l'induction de la production de MMP-9 et la libération de cytokines telles que l'IL-1 β par les cellules immunitaires. Ces événements fragilisent les jonctions serrées de l'endothélium de la BHE (Grygorowicz *et al.* 2018) et entraînent une augmentation de sa perméabilité (Armulik *et al.* 2010). Des traitements avec un antagoniste de P2RX7 (BBG) améliorent l'EAE chez le rat en diminuant la sévérité des déficits neurologiques, l'astroglie et la démyélinisation, tout en restaurant les niveaux de péricytes et de claudine-5 (Grygorowicz *et al.* 2016 ; Grygorowicz *et al.* 2018 ; Matute *et al.* 2007). Dans la SEP, il a été observé que P2RX7 médie des interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes, suggérant également un rôle dans les processus, régulant la perméabilisation de la BHE au cours de la maladie. De plus, la stimulation de P2RX7 par l'ATP ou le Bz-ATP dans des cellules HEK293 ou des astrocytes induit l'expression de HIF-1 α (Amoroso *et al.* 2012). HIF-1 α est un capteur métabolique qui diminue le nombre de Tregs Foxp3⁺

notamment en inhibant la différenciation des lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) (Mascanfroni *et al.* 2015) et qui stimule le développement des lymphocytes Th17. Les souris HIF-1 α KO sont résistantes à l'induction de l'EAE (Dang *et al.* 2011). Ainsi, P2RX7 pourrait également être impliqué dans l'EAE en contrôlant l'équilibre entre les lyT effecteurs et régulateurs *via* l'expression de HIF-1 α .

L'étude du rôle de P2RX7 dans le modèle EAE avec des souris P2RX7-KO ont montré des résultats contradictoires. Dans l'étude de Sharp *et al.* (2008), les souris P2RX7-KO exhibent une diminution de l'activité astrogliale associée avec une incidence réduite de l'EAE. Ils ont utilisé la souche GlaxoSmithKline (GSK) où l'inactivation se trouve au niveau de l'exon 1 : l'isoforme P2RX7-a est absent, mais l'isoforme P2RX7-k est toujours exprimé. La forme P2RX7-k est présente notamment dans les lyT qui ont alors une réponse accrue (**Figure 16**). Chaque isoforme possède ses particularités : (1) l'isoforme P2RX7-k est plus sensible à l'activation et est ainsi activé avec des concentrations d'agonistes inférieures. Son action est indépendante de la pannexine-1 (Xu *et al.* 2012) et (2) l'isoforme P2RX7-a, dont le segment C-terminal du récepteur interagit avec la pannexine-1, induit la formation de larges pores dans la membrane cellulaire et conduit à l'apoptose (Masin *et al.* 2012). Ainsi, dans ces souris P2RX7-KO GSK, les lyT pathogènes sont éliminés en partie par l'apoptose induite par P2RX7 dans le SNC comme dans les souris témoins (*wild-type*, WT). Cependant, la persistance de l'isoforme P2RX7-k sur les lyT chez les animaux P2RX7-KO GSK n'explique pas pourquoi l'incidence de l'EAE est réduite chez ces souris par rapport aux souris WT. Kanellopoulos and Delarasse (2019) émettent l'hypothèse que l'absence d'isoforme P2RX7-a dans les macrophages, les cellules dendritiques, la microglie, les mastocytes et les astrocytes pourrait diminuer la contribution de ces cellules aux réponses inflammatoires lors de l'EAE. Les mastocytes sont considérés comme des acteurs importants dans la perméabilisation de la BHE dans l'EAE (Secor *et al.* 2000). Le manque d'isoforme P2RX7-A sur les mastocytes chez les animaux P2RX7-KO GSK ne perméabilise probablement pas efficacement la BHE (Christy *et al.* 2013) et produit des niveaux inférieurs d'IL-1 β activant moins efficacement les lyT pour produire du GM-CSF (Russi *et al.* 2016). De plus, chez les souris P2RX7-KO GSK, les macrophages pathogènes n'expriment pas P2RX7-A, sont donc incapables de libérer l'IL-1 β et d'autres molécules inflammatoires comme le font les macrophages des souris WT. Aux stades précoces de l'EAE, les plaquettes ont infiltré le SNC avant même l'infiltration de lyT encéphalitogènes (Sonia D'Souza *et al.* 2018). Elles sont capables de dégranuler et de libérer plusieurs facteurs solubles dans le SNC dont potentiellement de très grandes concentrations d'ATP, pouvant activer les cellules exprimant P2RX7-A et augmenter l'inflammation chez les souris WT, mais pas chez les animaux P2RX7-KO GSK. De plus, CCL3 et CCL2 sont des chimiokines impliquées dans le recrutement de leucocytes dans le SNC. Or, la stimulation de P2RX7 entrainerait leur production par la microglie et les astrocytes (Martin *et al.* 2019 ; Panenka *et al.* 2001). Ainsi, le manque de P2RX7 sur les cellules gliales pourrait réduire l'infiltration des

lyT auto-réactifs et des macrophages dans le cerveau. Enfin, la disparition de l'isoforme P2X7-A sur les oligodendrocytes pourrait réduire leur mortalité et ainsi diminuer la démyélinisation (Domercq and Matute 2019). Tout cela atténuerait les lésions tissulaires dans le SNC et réduirait la pathologie de l'EAE chez les souris P2RX7-KO GSK. Bernal-Chico *et al* (2020) ont obtenu des résultats concordants sur l'effet protecteur en l'absence de P2RX7. Ils ont étudié le rôle de P2RX7 dans la démyélinisation et remyélinisation avec des souris P2RX7-KO dans le modèle de Cuprizone (impliquant une dégénérescence de la myéline indépendante des lyT). Dans cette étude, les souris P2RX7-KO ont présenté par rapport aux témoins, une diminution de la microglie de type M1 et d'astroglie et une démyélinisation atténuée accompagnée d'une diminution de l'expression des gènes codants pour des facteurs pro-inflammatoires. Mais le blocage de P2RX7 serait sans effets sur la remyélinisation (Bernal-Chico *et al.* 2020).

Au contraire, des études ont montré que des souris P2RX7-KO développent une expression clinique et pathologique plus sévère de l'EAE. Cet effet néfaste serait dû à une perte d'activité apoptotique liée à P2RX7 dans les lymphocytes (Chen and Brosnan 2006) et à l'augmentation des dommages axonaux lors du développement de l'EAE (Witting *et al.* 2006). Ils ont quant à eux utilisé la souche de souris Pfizer (Solle *et al.* 2001) où l'inactivation se situe au niveau du dernier exon, l'exon 13. Cette souche est donc déficiente pour l'isoforme a et k du P2RX7 (Figure 16). Une partie des différences observées entre ces études sur les souris KO peut s'expliquer par le modèle de souris P2RX7-KO utilisé et par l'expression différentielle des isoformes de P2RX7.

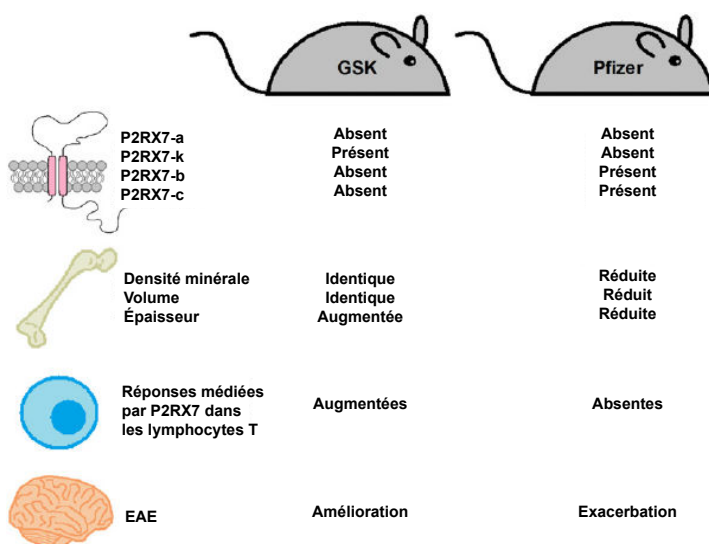


Figure 16 : Différences phénotypiques et fonctionnelles entre les souris GlaxoSmithKline (GSK) et Pfizer P2RX7 knock-out (KO) par rapport à leurs homologues de type sauvage (WT). Les différentes isoformes de P2RX7 sont exprimées selon la souche de souris, le phénotype osseux (densité minérale, volume et épaisseur), les réponses médiées par P2RX7 dans les lymphocytes T (formation de pores, excrétion de CD62L induite par les nucléotides, exposition à la phosphatidylsérine et mort cellulaire) et impact sur l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) entre les souris P2RX7 KO générées par GSK et Pfizer par rapport aux souris WT. D'après Bartlett *et al.* 2014

Des études d'association à l'ensemble du génome (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) de patients atteints de SEP (*Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium* 2009 ;

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2007, 2011, 2013 et 2018) ont identifié plusieurs allèles de gènes associés à un risque plus élevé de développer la SEP, mais aucun gène du P2RX7. Le P2RX7 est hautement polymorphe : un variant de P2RX7 donné peut donc être rare, voire absent. Il est donc difficile avec des études GWAS d'identifier des gènes aussi polymorphes. Cependant, Gu *et al.* (2015) ont génotypé 12 variants fonctionnels de P2RX7 dans trois cohortes de patients atteints de SEP et de sujets normaux. Ils ont identifié un variant génétique rare de P2RX7 appelé R307Q qui entraîne une perte de fonction de la formation de pores. Ce variant R307Q montre un effet protecteur contre la SEP et est associé à un autre variant R270H avec une perte partielle de la fonction de pores du P2RX7. Chez les patients, la combinaison de ces deux variants peut altérer la fonction de P2RX7 et réduire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés dans le SNC (Gu *et al.* 2015 ; Sadovnick *et al.* 2017). Alors que l'haplotype de gain de fonction H155T augmente le risque de développer la SEP (Oyanguren-Desez *et al.* 2011). De plus, une fréquence élevée d'un SNP de P2RX7 gain de fonction, A76V est plus fréquent chez les patients atteints de SEP (Oyanguren-Desez *et al.* 2011), ce qui suggère que les variants de P2RX7 peuvent jouer un rôle important dans la SEP.

En conclusion, ces différents travaux donnent un rationnel cohérent du rôle de P2RX7 dans les maladies auto-immunes et/ou inflammatoires et les maladies neurodégénératives, en particulier dans la SEP. En effet, des résultats préliminaires et intéressants ont été obtenus en utilisant des antagonistes de P2RX7 montrant qu'ils peuvent potentiellement servir comme moyen thérapeutique prometteur dans ces pathologies.

Chapitre 3. Développement et validation de la méthodologie AAVnano

Plusieurs outils ont été développés afin d'étudier la fonction de P2RX7, notamment des agents pharmacologiques et des anticorps spécifiques permettant une activation ou une inhibition de l'activité du récepteur.

3.1 Modulation de l'activité de P2RX7 en utilisant des agents pharmacologiques

3.1.1 Activation de P2RX7

En plus de l'ATP, plusieurs agonistes synthétiques existent (*cf.* 2.1.3 Les sources d'activation). Le Bz-ATP qui est l'agoniste le plus puissant développé à ce jour, est utilisable à des concentrations de 10 à 50 fois plus faibles que l'ATP. L'effet de l'ATP et du Bz-ATP peut être potentialisé *in vitro* dans des milieux contenant peu de Ca^{2+} et pas de magnésium (Mg^{2+}). Il peut aussi se lier à d'autres récepteurs P2X avec une affinité élevée comme P2RX1, P2RX2, P2RX3 et P2RX4 et, certains récepteurs P2Y comme P2RY11 (Burnstock 2012). D'autres agonistes de P2RX7 existent et sont classés suivant leur potentiel agoniste respectivement BzATP, ATP, ATP γ S, 2-MeSATP et α,β -meATP. Aucun agoniste n'est sélectif de

P2RX7 (De Marchi *et al.* 2016). Il est donc difficile d'interpréter les résultats obtenus dans les études les utilisant (Donnelly-Roberts *et al.* 2009 ; Hibell *et al.* 2000).

3.1.2 Inhibition de P2RX7

Différents types d'antagonistes de P2RX7 sont disponibles et se distinguent en fonction de leurs structures chimiques, modes d'antagonismes, spécificités et sélectivités d'espèces. On peut les classer soit en ligand orthostérique qui se lie au récepteur dans la cavité de liaison à l'ATP, soit en ligand allostérique qui se lie au récepteur sur un autre site que le site de liaison à l'ATP. Ils entraînent une diminution de l'effet du ligand endogène (l'ATP) (De Marchi *et al.* 2016). Le premier groupe est composé des suramines ou ses dérivés, les dérivés de l'ATP (TNP-ATP, ATP oxydée au périodate (oATP), et acide pyridoxal phosphate-6-azophényl-2-4-disulfonique (PPADS)) (Huo *et al.* 2018). Ces molécules sont de puissants antagonistes agissant à des niveaux de l'ordre du micromolaire, mais elles sont peu spécifiques et peuvent interagir avec d'autres récepteurs P2X (De Marchi *et al.* 2016). Dans le cas de l'oATP par exemple, il aurait des effets anti-inflammatoires indépendants du blocage de P2RX7 (Beigi *et al.* 2003 ; Di Virgilio *et al.* 2003). Les études utilisant l'oATP pour évaluer le rôle de P2RX7 dans les maladies inflammatoires, sont donc à prendre avec précaution. En outre, une nouvelle génération de composés inhibiteurs orthostériques a donc été créée afin d'être plus spécifique. Il comprend des dérivés du tétrazole (A438079, A839977) et des dérivés de la cyanoguanidine (A740003, A804598) qui fonctionnent à des concentrations de l'ordre du nM. Le second groupe de molécules inhibitrices (modulateurs allostériques négatifs) comprend le *Brilliant Blue G* (BBG), le KN-62, le *Reactive Blue 2*, le AZD9056, le AZ-11645373, le AZ-10606120, le GW791343, le GSK314181A, le GSK1482160, le CE-224,535, le AFC-5128, le JNJ-479655 et le EVT-401 (Savio *et al.* 2018). Elles sont efficaces à des concentrations de l'ordre du nanomolaire et micromolaire. Elles peuvent aussi interagir avec les sites allostériques d'autres récepteurs P2X. Par exemple, le BBG est un composé qui est généralement considéré comme un antagoniste spécifique de P2RX7, bien qu'il bloque d'autres récepteurs P2X (P2RX1, P2RX2, P2RX3, P2RX4 et P2RX5). Il bloque P2RX7 à des concentrations beaucoup plus faibles de l'ordre du nanomolaire contre des concentrations de l'ordre du micromolaire pour les autres récepteurs (Jiang *et al.* 2000). Des modifications structurales de ces composés ont été réalisées pour tenter d'améliorer leurs propriétés et leurs spécificités (Romagnoli *et al.* 2008). Par exemple, le MRS 2540 est basé sur la structure de KN-62 et présente une puissance accrue autant chez l'Homme que chez le rongeur (Lee *et al.* 2008 ; Hu *et al.* 2010). Parmi ces composés, le BBG et l'oATP restent les plus utilisés. Ils ont montré des effets thérapeutiques dans plusieurs modèles animaux : l'EAE, la colite expérimentale, la douleur inflammatoire chez les animaux arthritiques ou ayant une néphrite médiée par les anticorps (Bartlett *et al.* 2014 ; Arulkumaran *et al.* 2011 ; Matute *et al.* 2007 ; Taylor *et al.* 2009)

et plusieurs modèles tumoraux exprimant P2RX7 comme CT26, B16 ou HEK (Adinolfi *et al.* 2012). Les effets de l'inactivation de P2RX7 sont bénéfiques dans différents modèles animaux, même si ces petites molécules pharmacologiques manquent de spécificité et présentent plusieurs effets secondaires importants. De plus, elles ont des mécanismes d'action différents (par exemple, compétitif ou non compétitif, réversible ou irréversible, orthostérique ou allostérique) avec une variabilité dans les concentrations d'utilisations et selon l'espèce ciblée. Il est donc difficile de déterminer la concentration optimale d'utilisation. Ainsi, pour ces raisons, un antagoniste pharmacologique efficace dans un modèle de rongeur *in vivo* peut ne pas l'être chez l'Homme. Ce qui expliquerait en partie les échecs des études cliniques utilisant ces molécules antagonistes (Keystone *et al.* 2012 ; Eser *et al.* 2015).

3.2 Les modulateurs biologiques : des anticorps vers les nanocorps

Les produits biologiques offrent une plus grande spécificité et un meilleur ciblage de sous-ensemble de cellules. L'un des modulateurs biologiques, le plus utilisé de nos jours sont les anticorps (Ac). Ils présentent plusieurs avantages : ce sont de grosses molécules présentant une spécificité importante vis-à-vis d'une cible donnée et une longue durée de vie. En clinique, ils sont classiquement utilisés sous forme d'Ac monoclonaux, notamment dans le cadre du cancer et de maladies inflammatoires. Ils ciblent principalement des protéines membranaires et des cytokines, par exemple, le *rituximab* qui est un anticorps anti-CD20, le *erbitux* qui est un Ac anti-EGFR (le récepteur du facteur épidermique de croissance) ou l'*infiximab*, un Ac anti-TNF α .

Les Ac conventionnels présentent une structure de 150 kilodaltons (kDa) (**Figure 17**) : c'est une grosse protéine en forme de Y composée de deux chaînes polypeptidiques lourdes (*heavy*, H) et de 2 chaînes polypeptidiques légères (*light*, L) identiques. Ces dernières sont reliées par des ponts disulfures, entre la chaîne lourde et légère et entre les deux chaînes lourdes. Les chaînes lourdes sont constituées de 4 à 5 domaines immunoglobuliniques : un domaine variable (VH) et 3 à 4 domaines constants (CH1 à CH3 ou à CH4) selon l'isotype. Les chaînes légères, quant à elles, sont constituées de 2 domaines immunoglobuliniques : un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL). De plus, les régions constantes en C-terminale des chaînes lourdes appariées comprenant CH2 à CH3 (ou à CH4), déterminent le fragment cristallisable (*fragment crystallizable*, Fc). Le Fc médie les activités effectrices des Ac à savoir la neutralisation, la phagocytose (par opsonisation) et l'activation du complément. En outre, les régions variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) avec un domaine constant de chaque chaîne (CH1 et CL) à l'extrémité N-terminale forment le site de liaison à l'antigène (*fragment antigen-binding*, Fab). Plus précisément, le paratope est formé uniquement des domaines variables et est spécifique d'un épitope donné de l'antigène. Suite à des analyses de séquençages protéiques et

structurales, il a été mis en évidence qu'un domaine variable est composé de trois régions hypervariables (*Hypervariable regions*, HVR1 à HVR3) correspondant à des boucles appelées *complementary determining regions*, CDR1 à CDR3. Parmi les CDR, c'est la région CDR3 qui est la plus impliquée dans l'interaction avec l'épitope. Par ailleurs, ces trois CDR sont entre-coupées de quatre régions moins variables appelées régions charpentes (*framework region*, FR1 à FR4) qui permettent de structurer l'ensemble du paratope. Ce dernier interagit avec l'épitope : plus il est stéréospécifique et plus l'affinité est forte.

Les Ac sont divisés en 5 classes majeures selon leurs domaines constants : IgM, IgG, IgA, IgD et IgE (**Figure 17**). Les Ac conventionnels sont souvent plus spécifiques de leurs cibles et plus stables que les molécules pharmacologiques. Cependant, ils sont de taille relativement importante comparées à la surface exposée des canaux ioniques et leur biodistribution est donc limitée. Mais, plusieurs anticorps dont la majorité sert à bloquer P2RX7 (anticorps antagonistes) ont quand même pu être développés pour moduler la fonction du P2RX7 humain et murin. Les Ac inhibant le récepteur comprennent l'Ac monoclonal L4 (Buell *et al.* 1998) et 1F11 (Kurashima *et al.* 2012), alors que l'anticorps monoclonal Hano43 empêche l'ADP-ribosylation du P2RX7 murin (Möller *et al.* 2007). Au contraire, l'Ac Hano44 lui potentialise le P2RX7 murin (**Tableau 4**).

Anticorps monoclonaux	Effets sur la fonction de P2RX7	Effets biologiques <i>in vivo</i> dans différents modèles inflammatoires
mAc L4	Inhibe l'activation de P2RX7 chez l'Homme et le rat	Inhibe <i>in vitro</i> la libération d'IL-1 β induite par l'ATP :
mAc Hano43	Inhibe l'ADP-ribosylation de P2RX7 chez la souris	Non décrit
mAc Hano44	Potentialise l'activation de P2RX7 chez la souris	Non décrit
mAc 1F11	Inhibe l'activation de P2RX7 chez la souris	Améliore la colite expérimentale

Tableau 4 : Anticorps monoclonaux modulant la fonction de P2RX7 : Le tableau présente des anticorps monoclonaux anti-P2RX7 et leurs effets sur la fonction du récepteur, ainsi que leurs effets biologiques évalués *in vivo* dans différents modèles inflammatoires. D'après Koch-Nolte *et al.* 2019.

Il existe un dérivé d'Ac appelé fragment variable simple chaîne (*single-chain variable fragment*, scFv), où les domaines variables de la chaîne lourde (VH) et légère (VL) sont fusionnés avec un lien (*linker*) peptidique flexible d'environ 15 acides aminés : cela améliore la biodistribution notamment pour les cibles intracellulaires.

Des Ac particuliers constitués seulement des chaînes lourdes ont été découverts chez les camélidés. Ils sont appelés Ac à chaînes lourdes (*heavy chain antibody, HCAb*) d'une taille de 90 kDa. Leur fragment de liaison à l'antigène est constitué d'un seul domaine variable de la chaîne lourde de 15 kDa appelé *variable heavy-chain (VHH)*, qui constitue ce que l'on appelle un nanocorps (Ncs). Les Ncs présentent plusieurs avantages notamment d'un point de vue structural (**Figure 17**). En effet, le CDR3 des Ncs est généralement plus long et peut s'étendre dans les cavités présentes à la surface des antigènes (De Genst *et al.* 2006). Ces cavités correspondent le plus souvent à des régions fonctionnelles (comme un site de liaison du ligand ou allostérique) permettant de générer des Ncs ayant la capacité de bloquer ou de potentialiser l'action du récepteur. Cela est plus difficile avec les Ac conventionnels. Le second avantage est que les Ncs sont plus petits qu'un Ac classique et que ce fait permet de les moduler plus facilement. Par exemple, ils peuvent être fusionnés entre eux formant des Ncs bivalents ou avec d'autres Ncs afin de générer des Ncs bispécifiques. En outre, il est également possible d'ajouter une région Fc des Ac conventionnels, générant alors un Ncs à base de chaîne lourde d'Ac (hcAc ou Ncs-Fc optimisé) (Ingram *et al.* 2018 ; Steeland *et al.* 2016). Contrairement aux Ac, les Ncs monovalents ou bivalents ont une forte pénétration dans les tissus (Fang *et al.* 2018) et une clairance rénale rapide (demi-vie de moins de 30 minutes) (Tijink *et al.* 2008). La forme bivalente offre cependant une meilleure avidité et peut être utilisée pour augmenter la demi-vie et/ou la spécificité cellulaire. De plus, l'ajout d'une partie Fc offre la possibilité de jouer sur les fonctions effectrices de ces anticorps. On peut, par exemple, empêcher la liaison du complément et du récepteur au FcγR ou à l'inverse, augmenter la cytotoxicité dépendante du complément ou des Ac (Koch-Nolte *et al.* 2019). La demi-vie peut également être augmentée, par exemple, par fusion du Ncs avec l'albumine (Altintas *et al.* 2013). Par ailleurs, le format modulable du Ncs évite des problèmes de solubilité et de mésappariements inhérents aux parties VH-VL et aux interactions hydrophobes présentes pour les Ac conventionnels (Bannas *et al.* 2017).

Les Ncs sont donc des protéines plus petites et aussi spécifiques qu'un Ac, mais plus flexibles et ayant une meilleure solubilité (Muyldermans *et al.* 2013) et une grande stabilité (Van Der Linden *et al.* 1999). En raison de ces caractéristiques, les Ncs offrent une bonne alternative aux Ac conventionnels et sont de plus en plus utilisés dans une variété d'application, notamment dans l'administration de médicaments dans le cadre de l'imagerie en utilisant des Ncs couplés à des radio-isotopes : par exemple, le *Caplacizumab*, un Ncs dirigé contre le facteur de von Willebrand qui est utilisé dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis et le ⁶⁸Ga-NOTA-Anti-MMR-VHH2 utilisé pour détecter des cancers pulmonaires, de la tête et du cou ou des mélanomes (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03331601) (Berland *et al.* 2021).

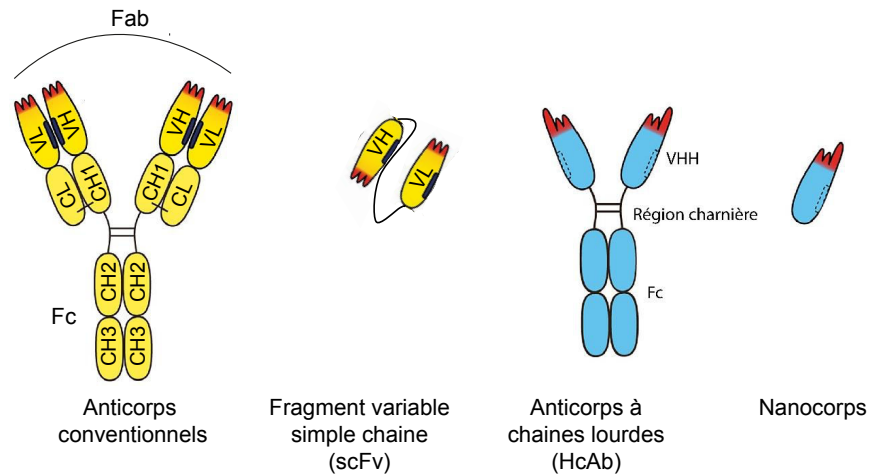


Figure 17 : Représentation et comparaison entre les anticorps conventionnels et les nanocorps. Les anticorps conventionnels sont composés de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) identiques. La chaîne lourde est composée de 4 à 5 domaines avec un domaine variable (VH) et 3 à 4 domaines constants (CH). La chaîne légère est composée de 2 domaines dont un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL). Le fragment cristallisable (fragment cristallizable, Fc) est composé de 2 à 3 domaines constants de la chaîne lourde en C-terminale (CH2 à CH3 ou à CH4). Le fragment de liaison à l'antigène (fragment antige-binding, Fab) est composé des domaines variables et constants des chaînes lourdes (VH et CH1) et légères (VL et CL) en N-terminale. Les domaines VH et VL interagissent via des interactions hydrophobes (ovales noires). En rouge est représenté le paratope, composé de 3 régions hypervariables (CDR ou HVR) et de 4 régions charpentes (FR). Des anticorps particuliers appelés fragment variable simple chaîne (scFv) est composé du domaine VH et VL relié d'un linker. Les anticorps à chaînes lourdes (HcAb) comportent uniquement les chaînes lourdes. Elles sont constituées d'un seul domaine reconnaissant l'anticorps (VHH), de la région charnière et de la partie Fc. Les nanocorps ne sont composés que d'un fragment VHH. D'après Koch-Nolte et al. 2019.

3.3 La méthodologie AAVnano

Comme dans le cas des molécules pharmacologiques, les Ac et les Ncs thérapeutiques sont classiquement injectés par voie systémique (voie intraveineuse) pour maximiser la biodistribution et sont capables de traverser l'endothélium pour atteindre la surface des cellules cibles dans le parenchyme tissulaire. D'autres voies d'administration ont été étudiées dont la voie respiratoire *via* des aérosols (van Heeke *et al.* 2017). Cependant, ces injections systémiques dans le cadre des pathologies cérébrales sont insuffisantes car les Ac n'arrivent pas à passer la BHE : seulement l'équivalent de 0,1% de la dose injectée est retrouvée dans le SNC (Zhao *et al.* 2022). Dans ce contexte, une étude menée en collaboration avec notre laboratoire a étudié l'administration intracérébroventriculaire (ICV) de Ncs ciblant P2RX7, qui serait une voie utilisable dans les pathologies cérébrales (Pinto-Espinoza *et al.* 2022). Ce travail sera détaillé ultérieurement (cf Résultats). L'autre possibilité est de modifier les Ac et Ncs afin d'améliorer leur passage au travers de la BHE avec par exemple, un ligand pour un récepteur de transcytose impliqué dans le transport cérébral. Les récepteurs de transcytoses actuellement connus permettant un passage au travers de la BHE peuvent

être regroupés en trois types : les transporteurs du fer (par exemple, le récepteur de la transferrine (TfR)), les transporteurs de l'insuline (par exemple, le récepteur de l'insuline (IR)) et (les transporteurs de lipides (par exemple LRP1, *LDL receptor related protein 1*). par exemple le récepteur à la transferrine (Stanimirovic *et al.* 2014 ; Niewoehner *et al.* 2014). Enfin, les Ac et Ncs ont une demi-vie courte. Pour avoir un effet qui perdure dans le temps, il faudrait donc multiplier les injections parfois quotidiennement. Ces deux grands inconvénients limitent l'utilisation d'Ac ou de Ncs recombinants dans des modèles chroniques notamment du SNC (Demeules *et al.* 2020). Il est donc nécessaire de développer d'autres méthodologies.

Une autre alternative émergente est l'utilisation de vecteurs de virus adéno-associés (*Adeno-associated virus*, AAV), qui permettent la production endogène des anticorps directement *in vivo*. L'utilisation des AAV comme vecteurs pour exprimer de manière stable des transgènes *in vivo* a été réalisée dès 1993 par Flotte *et al.* Ils ont montré que l'administration d'AAV codant pour l'ADNc du gène CFTR (*normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) permet une détection du CFTR jusqu'à 6 mois après administration de l'AAV. De plus, une étude utilisant des AAV codant pour une protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP) a montré une expression différentielle selon les voies d'administration (intraveineuse, intramusculaire ou intrapéritonéale) et selon le sérotype des AAV (cela est détaillé plus tard). Les protéines GFP pouvaient être détectées dans tout l'organisme et ce, jusqu'à 6 mois (Wang *et al.* 2005). Plus récemment, il a été montré qu'une seule injection intramusculaire d'AAV codant *in vivo* pour des Ac anti-VIH neutralisants, a permis d'obtenir chez des souris et des primates non humains, des taux sériques durables d'Ac thérapeutiques : cette méthode a été appelée immunoprophylaxie vectorielle (Brady *et al.* 2017).

3.3.1 Les AAV

3.3.1.1 Les AAV

Les virus adéno-associés ont été découverts pour la première fois dans les années 60, par microscopie électronique à partir de préparations en laboratoire d'adénovirus (AdV) (Atchison *et al.* 1965 ; Hoggan *et al.* 1966). Un peu plus tard, ces AAV sont également retrouvés dans le tissu humain (Blacklow *et al.* 1967). Les AAV sont des *parvovirus* à ADN simple brin encapsidé avec un génome de 4,7 kilobases (kb), des gènes *rep* et *cap* flanqués de répétitions terminales inversées (*inverted terminal repeats*, ITR). Le gène *rep* code pour des protéines concernées dans la réplication virale, l'encapsidation et l'intégration génomique (nommés selon leur masse moléculaire : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40). Le gène *cap*, lui, code pour la protéine d'activation de l'assemblage (*assembly activating protein*, AAP) et les protéines structurales (VP1, VP2, VP3), qui forment la capsidie en s'assemblant. Après son entrée dans la cellule (par endocytose) puis dans son noyau et après la synthèse d'un second brin d'ADN, le virus AAV a

besoin d'un virus dit auxiliaire, comme l'adénovirus, pour entrer dans son cycle de réplication. En absence d'assistance de ce virus auxiliaire, l'AAV peut entrer en latence et persiste sous forme d'épisome ou dans certains cas s'intègre dans l'ADN chromosomique de l'hôte. Les AAV sont présents dans de nombreuses espèces vertébrées dont l'Homme. Actuellement, il est admis que les AAV ne sont pas pathologiques pour l'Homme (Santiago-Ortiz and Schaffer 2016).

Le tropisme de ces vecteurs AAV est principalement déterminé par les interactions entre la capsid et les récepteurs membranaires exprimés à la surface cellulaire des cellules cibles. La reconnaissance de protéines membranaires par l'AAV et des co-récepteurs nécessaires, entraîne son internalisation par endocytoses. Des particules de l'AAV (VP1/VP2) dans l'endosome sont ensuite modifiées structurellement selon le pH. Cette modification structurelle permet la fuite de l'endosome, l'expression de signaux de translocation nucléaire et leur transit au travers du cytosol *via* le cytosquelette. L'AAV pénètre ensuite dans le noyau cellulaire *via* des pores nucléaires. Dans le noyau, l'AAV libère son génome après décapsidation. Le génome de l'AAV étant simple brin, il ne permet pas l'expression immédiate. Il faut donc une étape supplémentaire permettant la synthèse autoamorcée à partir des ITR et l'obtention d'un ADN bicaténaire pour que la transcription commence. Cette étape est limitante dans la transduction de l'AAV. Après cette étape de synthèse du brin complémentaire, l'ADN double brin de l'AAV peut : (1) soit être transcrit en ARNm permettant ensuite l'expression du transgène, (2) soit subir une circularisation par recombinaison génomique au niveau des ITR, stabilisant le génome en ADN épisomique. Cet ADN épisomique permet une expression génique à long-terme dans les cellules (**Figure 18**) (Wang *et al.* 2019).

3.3.1.2 Les AAV comme vecteurs

Les vecteurs AAV recombinants (rAAV) sont principalement utilisés dans le cadre de l'administration *in vivo* de thérapies géniques. Les rAAV sont générés en conservant les ITR et en remplaçant les gènes endogènes *rep* et *cap* par une cassette d'expression qui comprend : un promoteur, le transgène d'intérêt et une queue polyadénylée (polyA). Les gènes *cap* et *rep* nécessaires à l'encapsidation sont alors fournis en *trans* dans un *helper* ou « *construction d'emballage* » avec les gènes auxiliaires adénoviraux nécessaires. C'est cette élimination des séquences virales qui permet la faible immunogénicité et cytotoxicité des rAAV administrés *in vivo*. Concrètement, les rAAV sont composés de la même structure capsidique que les AAV sauvages, mais ils encapsident un gène différent. La taille limite du transgène est imposée par la petite taille de l'AAV, soit inférieure à 5,0 kb. Sa conception doit donc prendre en compte la séquence du transgène, mais également des éléments régulateurs nécessaires à son expression tels que le promoteur ou la queue polyA. Des rAAV ont été développés

avec un transgène déjà bicaténaire pour améliorer la transduction (*scAAV*, *self complementary AAV*). Ils ont une cinétique d'expression plus rapide que les rAAV classiques composés d'un transgène simple brin (*ssAAV*, *single stranded AAV*) (**Figure 18**, Wang *et al.* 2019).

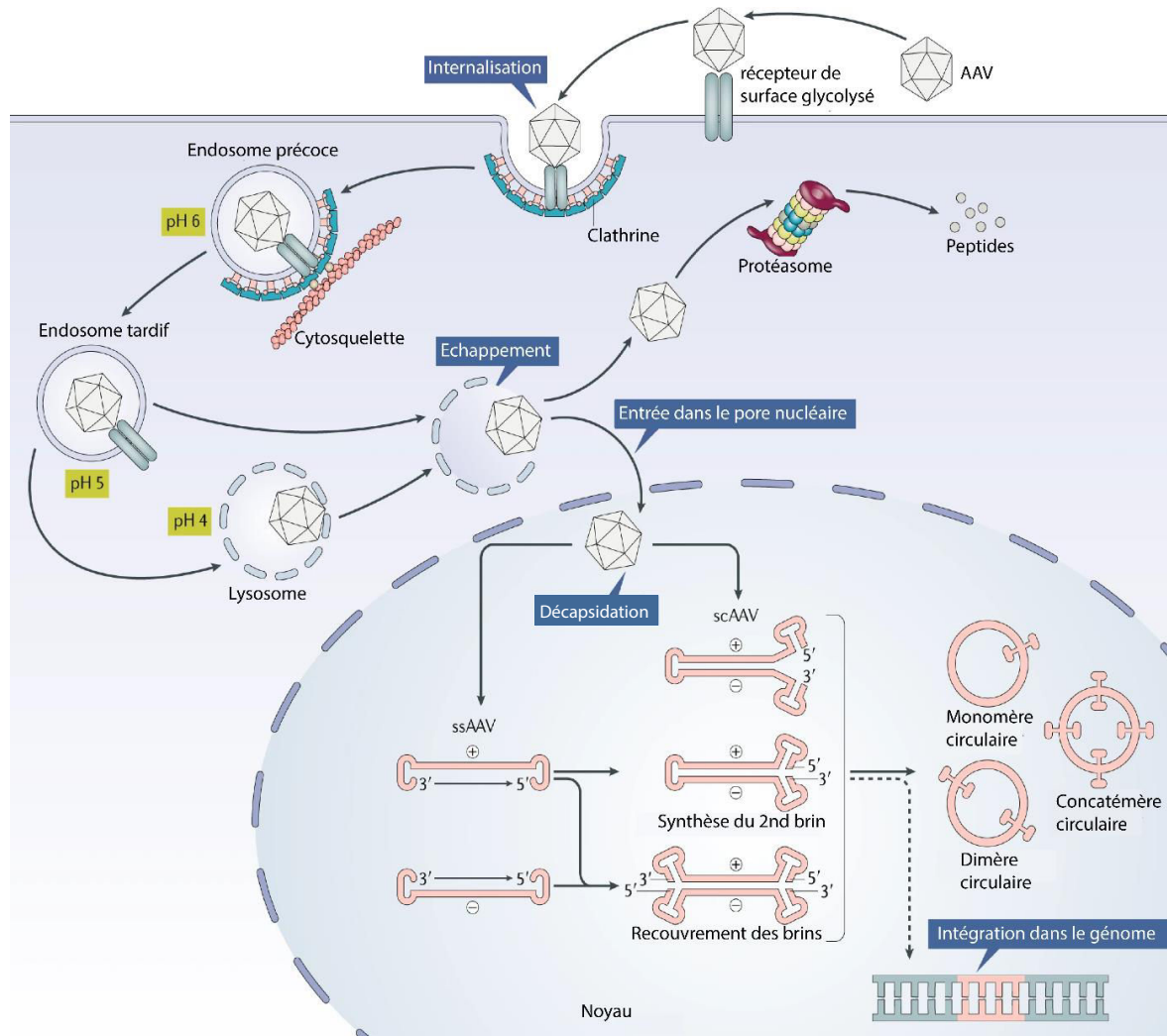


Figure 18 : Mécanismes impliqués dans la transduction des AAV. Les AAV sont reconnus par des récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles. Cela entraîne l'internalisation du vecteur via l'endocytose par les clathrines. L'AAV circule alors dans le cytosol via le réseau cytosquelettique. En raison de l'environnement à pH acide de l'endosome (issu de la fusion avec le lysosome), la région VP1/VP2 subit un changement conformationnel nécessaire à l'échappement endosomal et à leur trafic à travers le cytosol via le réseau cytosquelettique. Les AAV vont être transportés dans le noyau au travers de pores nucléaires. Enfin, ils vont se désencapsider et peuvent également subir une protéolyse par le protéasome. L'AAV présente un génome simple brin transcriptionnellement inerte lorsqu'il atteint le noyau et doit être converti en ADN double brin. Cette conversion peut être réalisée par la synthèse d'un second brin par les ADN polymérases de la cellule hôte ou par la recombinaison des brins sens et antisens qui peuvent exister dans le noyau. Pour les AAV recombinants (rAAV), deux classes de rAAV sont utilisées selon la forme du transgène utilisé : les rAAV à brin unique (*ssAAV*) qui passe par les mêmes mécanismes que l'AAV et les rAAV *self complementary* (*scAAV*). Comme les *scAAV* sont déjà bicaténaires, ils peuvent immédiatement être transcrits. Enfin, les ITR virales peuvent entraîner une recombinaison intra ou intermoléculaire pour former des génomes épisomiques circularisés, qui

peuvent persister dans le noyau. Les génomes des vecteurs peuvent également subir une intégration dans le génome de l'hôte, mais à des fréquences plus faibles. D'après Wang et al. 2019.

3.3.1.3 Les sérotypes

Un sérotype regroupe par définition les variants ayant des caractéristiques antigéniques de certains microorganismes et étant classés selon leur réaction en présence d'anticorps sériques. Il existe à ce jour douze sérotypes d'AAV connus et classés selon des analyses phylogénétiques et l'isolement de plus de cent variants à partir de stock d'adénovirus et de tissus humains et primate non humain. Le 1^{er} sérotype découvert fut le sérotype 2 (AAV2) en 1982 (Samulski *et al.* 1991) et présente : une absence de pathogénicité, un tropisme large et une expression à long-terme du transgène. Ce sérotype est couramment utilisé en thérapie génique : par exemple dans l'hémophilie, la mucoviscidose et la polyarthrite rhumatoïde. Cependant, le manque de spécificité d'organes est un problème qui nécessite d'être amélioré *via* possiblement la modification de la capsid.

Des AAV de sérotypes différents ne présentent pas de réactions croisées avec des sérums neutralisants d'autres sérotypes. D'après cette définition, seuls les sérotypes AAV1 à 5 et AAV7 à 9 ne présentent pas de réactions croisées. Les autres sérotypes AAV6, 10 et 11, quant à eux, réagissent à des sérums neutralisants d'autres sérotypes : par exemple l'AAV 6 est presque identique à l'AAV 1 (Gao *et al.* 2002; Grimm *et al.* 2003). Les différents sérotypes présentent différents tropismes en fonction de l'expression de protéines différentes à la surface de leur capsid (Rabinowitz *et al.* 2002 ; Grimm *et al.* 2006). Les sérotypes dominants reconnaissent des récepteurs cellulaires distincts tels que les glycoprotéines et présentent des tropismes et un taux de transduction différents (**Tableau 5**).

Sérotypes	Origines	Tropismes
AAV1	Primate non humain	Muscles, système nerveux central, cœur, foie, poumons
AAV2	Humain	Cœur, système nerveux central, foie, poumons, rétines
AAV3	Primate non humain	Foie
AAV4	Primate non humain	Rétines, poumons, reins
AAV5	Humain	Rétines, système nerveux central, foie
AAV6	Humain	Cœur, foie, muscles, rétines
AAV7	Primate non humain	Foie
AAV8	Primate non humain	Muscles, cœur, système nerveux central, foie
AAV9	Humain	Cœur, système nerveux central, foie
AAV10	Primate non humain	Muscles, tissus myoblastiques
AAV11	Primate non humain	Muscles, tissus myoblastiques
AAV12	Primate non humain	Glandes salivaires, muscles

Tableau 5 : Tropismes des différents sérotypes des AAV et leurs origines. D'après Ling et al. 2018.

L'utilisation d'un autre sérotype que l'AAV2 (utilisé classiquement) permet donc potentiellement de réduire la quantité de vecteurs nécessaires, s'il présente une meilleure transduction. Cela permet également d'éviter les anticorps neutralisants contre l'AAV2, potentiellement générés lors d'infections à l'AAV2 (correspondant à 70 % de la population). Par ailleurs, des études utilisent ces différents sérotypes comme modèles pour la conception de nouvelles protéines capsidiques et pour pouvoir cibler un tissu spécifique : cela permet d'élargir le nombre de sérotype disponible. On peut citer, par exemple, le sérotype AAV-DJ, un hybride courant qui contient une capsidique hybride dérivée de huit sérotypes. Cet AAV-DJ présente une efficacité de transduction plus élevée *in vitro* que n'importe quels autres sérotypes sauvages et, *in vivo*, il montre un tropisme large (Grimm *et al.* 2008). Des vecteurs AAV peuvent également être obtenus en insérant dans les protéines capsidiques des Ncs permettant un ciblage cellulaire plus spécifique. En effet, des Ncs ciblant P2RX7 ou CD38 (une glycoprotéine membranaire de type 2) ont permis *in vitro* un ciblage spécifique des cellules exprimant ces récepteurs (Eichhoff *et al.* 2019). La seconde stratégie, développée pour augmenter la spécificité des vecteurs AAV, est d'utiliser des promoteurs spécifiques d'un type cellulaire pour obtenir l'expression du transgène uniquement dans les cellules cibles (Koch-Nolte *et al.* 2019).

3.3.2 Validation de la méthodologie AAVnano

Plusieurs Ncs ont été développés par nos collaborateurs pour moduler (potentialiser ou inhiber) l'activité de P2RX7 (**Tableau 6**) : le Ncs Dano1 inhibe le P2RX7 humain (Buell *et al.* 1998 ; Danquah *et al.* 2016), le Ncs 13A7 inhibe le P2RX7 murin alors que le Ncs 14D5 (modulateur allostérique positif) potentialise l'activation du P2RX7 murin en diminuant le seuil d'ATP nécessaire à son activation (Danquah *et al.* 2016). Comme expliqué précédemment, plusieurs formats de ces Ncs ont été générés : (1) monovalents ou bivalents afin de jouer sur leur spécificité et (2) couplage à un Ncs anti-albumine ou un fragment Fc afin d'augmenter leur demi-vie. Ces nanocorps anti-P2RX7 ont montré une spécificité importante : aucune liaison détectable avec d'autres P2X (Koch-Nolte *et al.* 2019). En outre, ces candidats ont été testés et caractérisés *in vitro* par des expériences de shedding (correspondant à la perte du marqueur CD62L lors de l'activation de P2RX7), de patch clamp et de mesures du calcium. Les résultats montrent que le Ncs 13A7-Fc est l'antagoniste, le plus puissant parmi les Ncs anti-P2RX7 générés et que le Ncs 14D5-DimHLE, le potentialisateur le plus efficace (Danquah *et al.* 2016). Ces deux Ncs sélectionnés correspondent à : (1) des homodimères (bivalents) avec une demi-vie prolongée grâce à la fusion avec le nanocorps spécifique à l'albumine (Alb8) (Ncs-HLE) pour les Ncs 14D5-DimHLE et (2) des homodimères (bivalents) fusionnés avec un IgG1 d'Ac conventionnel murin (Nc-Fc) avec une mutation LSF afin d'augmenter sa demi-vie pour les Ncs 13A7-Fc (**Figure 19**).

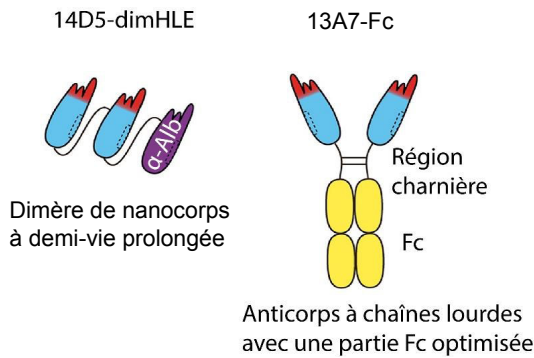


Figure 19: Nanocorps utilisés dans cette étude. Le nanocorps 14D5-DimHLE est un dimère de nanocorps couplé à un nanocorps anti-albumine permettant de prolonger considérablement sa demi-vie. Le nanocorps 13A7-Fc est couplé à une partie Fc (IgG1 murine avec une mutation LSF) optimisée permettant d'augmenter sa demi-vie. D'après Koch-Nolte et al. 2019.

Nanocorps	Effets sur la fonction de P2RX7	Effets biologiques <i>in vivo</i> dans différents modèles inflammatoires
Ncs Dano1	Inhibe l'activation de P2RX7 chez l'homme	Inhibe la libération d'IL-1 β induite par l'ATP
Ncs 13A7	Inhibe l'activation de P2RX7 chez la souris	Améliore la glomérulonéphrite expérimentale et la dermatite de contact
Ncs 14D5	Potentilise l'activation de P2RX7 chez la souris	Aggrave la glomérulonéphrite expérimentale
Ncs S+16	Inhibe l'ADP-ribosylation de P2RX7 chez la souris	Améliore le diabète de type 1

Tableau 6 : Nanocorps modulant la fonction de P2RX7. Le tableau présente des nanocorps spécifiques de P2RX7 capables soit de l'inhiber, soit de potentialiser son activité. Il montre également l'impact de leur utilisation *in vivo* dans différents modèles inflammatoires. D'après Koch-Nolte et al. 2019.

Ces Ncs ont été utilisés dans des études *in vivo* pour réévaluer le rôle de P2RX7 dans différents modèles pathologiques murin. Les études ont montré après des injections systémiques (intraveineuses et intrapéritonéales) répétées de Ncs 13A7-DimHLE une amélioration de la pathologie, grâce à une diminution de l'inflammation dans la dermatite allergique (modèle de dermatite de contact en réponse à l'allergène 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (DNFB)) et dans la glomérulonéphrite expérimentale. Alors qu'à l'inverse, les injections répétées (intraveineuses et intrapéritonéales) de 14D5-DimHLE *in vivo* ont entraîné dans ces deux modèles une aggravation de la maladie illustrée par : une augmentation de l'inflammation et des lésions rénales (Danquah *et al.* 2016). L'utilisation de ces Ncs anti-P2RX7 représentent donc un nouveau moyen efficace d'étudier P2RX7 *in vivo* dans différentes situations physiopathologiques, afin de confirmer son potentiel comme cible thérapeutique. Ces Ncs pourraient devenir de nouveaux candidats médicaments prometteurs.

Une technique semblable à l'immunoprophylaxie vectorielle a été développée dans le laboratoire, appelée AAVnano permettant de produire *in situ* les Ncs anti-P2RX7 de façon durable. Cela consiste à

utiliser des rAAV de sérotype 1 codant pour l'un de ces deux candidats Ncs anti-P2RX7 optimisés (Ncs 13A7-Fc et Ncs 14D5-DimHLE). Cette technologie AAVnano permet après une injection intramusculaire unique une production *in vivo* des Ncs correspondants pendant au moins 120 jours (Pinto-Espinoza *et al.* 2022). Une réponse inflammatoire contre les Ncs produits et les rAAV est possible : mais comme les Ncs persistent jusqu'à 120 jours, on peut considérer qu'elle est négligeable. L'intérêt de cette technologie est double : (1) d'éviter les injections quotidiennes nécessaires pour maintenir un niveau optimal de Ncs recombinants pour moduler l'activité de P2RX7 et (2) donc de permettre une modulation de l'activité de P2RX7 (potentialisation ou inhibition) dans des modèles d'inflammation chronique ou de maladies auto-immunes (Demeules *et al.* 2020)(Figure20)

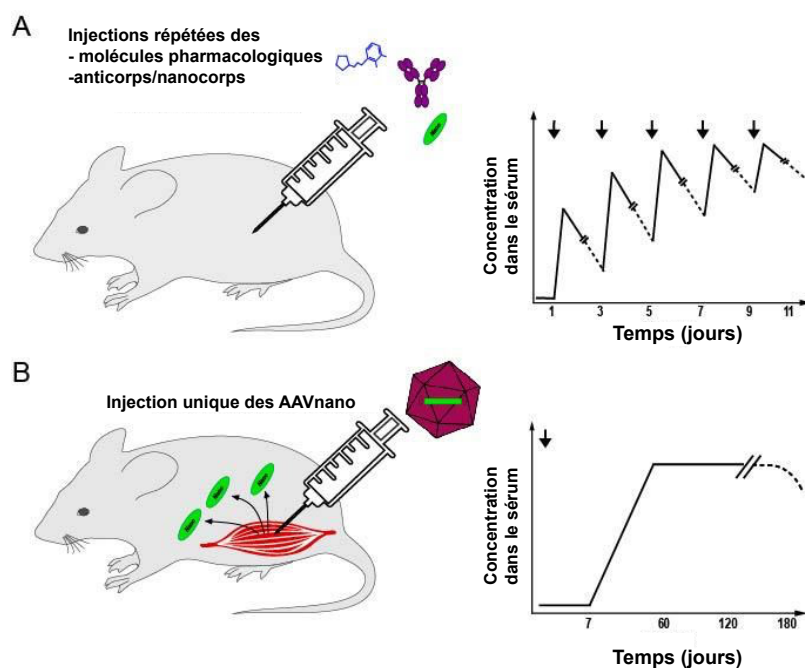


Figure 20 : Comparaison entre l'injection répétée de médicaments ou d'anticorps/nanocorps et la méthodologie AAVnano. (A) Les petites molécules pharmacologiques (bleu), les anticorps (violet) ou les nanocorps (vert) sont généralement injectés en intrapéritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.) et nécessitent des injections répétées. **(B)** La méthodologie AAVnano permet avec une seule injection intramusculaire (i.m.) des AAV codant pour les nanocorps, leur production *in situ* et à long-terme. Cela permet d'éviter les injections répétées de molécules pharmacologiques ou biologiques. D'après Demeules *et al.* 2020.

Dans ce contexte, au cours de ma thèse, nous avons utilisé cette technologie AAVnano codant pour le Ncs 13A7-Fc ou le Ncs 14D5-DimHLE afin d'étudier *in vivo* leur rôle dans des modèles murins de SEP (EAE, Cuprizone) et d'évaluer le potentiel de P2RX7 comme une nouvelle cible thérapeutique.

II. Objectifs

Objectifs de la thèse

Dans la SEP, les thérapies existantes ont peu d'effets sur les formes sévères progressives. Ainsi, la recherche de nouvelles thérapies qui pourraient bloquer à la fois l'inflammation et la neurodégénérescence, tout en favorisant la remyélinisation et la neurorégénération, est devenue essentielle. Au vu de la littérature, le récepteur P2RX7 semble être une cible thérapeutique prometteuse dans les maladies inflammatoires, auto-immunes et neurodégénératives. Comme cela a été énoncé auparavant, des résultats intéressants ont d'ailleurs été obtenus dans des modèles de ces pathologies, en utilisant des inhibiteurs de P2RX7 qui sont peu spécifiques ou des souris déficientes pour le P2RX7. Cependant, ces données restent incomplètes, voire contradictoires notamment dans des modèles de SEP et nécessitent donc des études plus approfondies afin de caractériser au mieux le rôle de P2RX7 dans le développement de cette pathologie et son intérêt thérapeutique.

Récemment, le développement de nanocorps spécifiques de P2RX7 (pouvant soit l'inhiber ou l'activer) a fourni un moyen d'étudier *in vivo* son rôle dans différents modèles. Cependant, l'administration de ces nanocorps (Ncs) recombinants par voie systémique présente plusieurs inconvénients, notamment dans les modèles chroniques du SNC : une répétition nécessaire des injections parfois quotidiennes afin de préserver un taux suffisant de nanocorps au fil du temps et leur incapacité à traverser la BHE. Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient : (1) d'évaluer *in vivo* (*i.e.* production des Ncs, ciblage de cellules exprimant P2RX7 par les Ncs et fonctions des Ncs *i.e.* inhibition de P2RX7) la technologie AAVnano développée par le laboratoire et introduite précédemment en utilisant des vecteurs de thérapie génique (rAVV) codant pour des nanocorps antagonistes de P2RX7 (article Pinto), (2) de valider *in vivo* l'utilisation de cette méthodologie dans des modèles de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI, modèles de colite induite par le DSS) (article 1 Abad et al. 2023) et de pathologies inflammatoires/autoimmunes et neurodégénératives telles que la SEP (modèle d'EAE induite par le MOG₃₅₋₅₅) (article 3 Guillou et al.) et (3) donc de mieux définir le rôle de P2RX7 dans la pathophysiologie de ces maladies, notamment dans la SEP et d'évaluer le potentiel thérapeutique de nanocorps anti-P2RX7 antagonistes en utilisant cette technologie AAVnano.

III. Résultats

Résultats

Article 1, en cours de révision chez *Journal of nanobiotechnology*.

Administration of an AAV vector coding for a P2RX7 blocking nanobody-based biologics ameliorates colitis in mice. Catalina Abad*, Mélanie Demeules*, Charlotte Guillou, Henri Gondé, Rachid Zoubari, Yossan-Var Tan, Valérie Vouret-Criaviari, Friedrich Koch-Nolte, Sahil Adriouch.

Contexte de l'étude. Comme expliqué dans l'introduction, plusieurs études suggèrent que P2RX7 joue un rôle important dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). P2RX7 est exprimé dans le tractus gastro-intestinal par des cellules immunitaires et non immunitaires (*i.e.* les cellules épithéliales). De plus, cette expression est augmentée dans l'épithélium et la lamina propria en condition pathologique (maladie de Crohn). Tout cela suggère que P2RX7 joue un rôle dans la pathogenèse de cette maladie. D'autant plus qu'il a été montré que des souris déficientes pour P2RX7 présentaient une baisse de l'inflammation dans les modèles de colite induite par le sulfate de sodium dextran (DSS) ou l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS), le blocage de ce récepteur serait donc bénéfique. Cependant, une étude de Hofman et collaborateurs utilisant le modèle de colite chronique induite par plusieurs cycles de DSS, et avec une injection d'un agent carcinogène à faible dose (AOM/azoxymethane), a également mis en évidence que le blocage de P2RX7 augmentait la carcinogenèse (Hofman *et al.* 2015). Des nanocorps (Ncs) ciblant P2RX7 et le modulant (bloquant ou potentialisant) ont été développés avec nos collaborateurs Allemands (équipe de Koch-Nolte) pour moduler la fonction de P2RX7 *in vivo*. La nouvelle méthodologie AAVnano permettant la production à long-terme *in vivo* de ces Ncs anti-P2RX7 a été utilisée ici pour valider l'importance de P2RX7 comme cible thérapeutique dans les colites aiguës et chroniques induites par le DSS chez la souris.

Méthodes. Pour l'étude du rôle de P2RX7 dans l'inflammation aiguë et chronique de l'intestin, les AAVnano codant pour des Ncs bloquant (13A7-Fc) et potentialisateurs (14D5-DimHLE) de P2RX7 ont été injectés une seule fois en intramusculaire (i.m.) trois semaines avant d'induire le modèle de colite intestinale par injection de DSS. Pour étudier le rôle de P2RX7 dans la carcinogenèse associée à l'inflammation chronique de l'intestin, nous avons injecté des AAVnano trois semaines avant l'injection d'AOM, puis réalisé le premier cycle de DSS une semaine après.

Principaux résultats. Nous avons testé différentes constructions basées sur des Ncs dans deux formats différents (DimHLE ou Fc). Nous avons sélectionné deux constructions, Ncs 13A7-Fc antagoniste et Ncs 14D5-dimHLE potentialisateur de P2RX7. Nous avons constaté qu'une seule injection i.m. de vecteur AAVnano pouvait moduler efficacement la fonction de P2RX7 à la périphérie *in vivo* à partir du jour 15 et jusqu'à au moins 120 jours après l'injection d'AAV et ce, de manière dose-dépendante (évaluation

sur des échantillons sanguins). L'administration d'AAVnano codant pour la construction 13A7-Fc (blocage de P2RX7), a considérablement amélioré la colite induite par le DSS, avec une baisse du score histopathologique du côlon, une réduction de l'infiltrat immunitaire et une baisse d'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires dans les tissus du côlon. Dans le modèle de carcinogenèse associé à la colite inflammatoire chronique, nous n'avons pas pu obtenir de résultats significatifs. Il est peut-être nécessaire de modifier certaines conditions comme la dose d'AOM ou le temps de sacrifice.

Conclusion. Nos résultats démontrent la validité de la méthodologie AAVnano pour inhiber ou potentialiser les fonctions P2RX7 *in vivo* en périphérie à long-terme et pour évaluer son rôle dans le cadre de modèles physiopathologiques. En appliquant cette méthode à la colite induite par le DSS, nous avons montré que le blocage de P2RX7 par les nanocorps antagonistes réduit l'inflammation et la gravité de la maladie. Cela valide l'importance de P2RX7 comme cible thérapeutique dans les MICI. L'étude met en évidence également le potentiel pharmacologique des constructions à base de nanocorps comme nouvelle classe de produits biologiques pouvant être utilisés pour moduler la fonction cible *in vivo*.

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

Catalina Abad*¹, Melanie Demeules*¹, Charlotte Guillou¹, Henri Gondé¹, Rachid Zoubairi¹, Yossan-Var Tan¹, Carolina Pinto-Espinoza², Waldemar Schäfer², Anna Marei Mann², Valérie Vouret-Craviari^{3,4}, Friedrich Koch-Nolte², Sahil Adriouch¹

1. University of Rouen, INSERM, U1234, Pathophysiology Autoimmunity and Immunotherapy (PANTHER), Normandie Univ, 76000 Rouen, France.
2. Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.
3. Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, Nice, France
4. FHU OncoAge, Nice, France

*Both authors contributed equally to this study

Submitting author / correspondence:

Sahil ADRIOUCH

University of Rouen, Faculty of Medicine and Pharmacy

INSERM U1234 – PANTHER Lab

22 Boulevard Gambetta

CS 76183

76000 Rouen, France

Phone: +33 2 35 14 85 43

sahil.adriouch@univ-rouen.fr

ORCID: *Sahil Adriouch*, <https://orcid.org/0000-0002-0265-7773>

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

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

Running title : blocking P2X7 with nanobody-based biologics in IBD

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

Bullet point summary:

What is already known

- P2X7 is a potential target in inflammatory diseases and agonistic/antagonistic nanobodies directed against P2X7 have been developed
- AAV represent safe and efficient vectors for gene transfer *in vivo*

What this study adds

- Long-term production and modulation of P2X7 activity by AAV coding for P2X7-targeting nanobody-based biologics
- Single injection of AAV coding for nanobody-based biologics that inhibiting P2X7 ameliorates murine DSS-colitis

Clinical significance

- This study validates the importance of P2X7 as a relevant target in inflammatory diseases
- Highlights the pharmacological potential of nanobody-based constructs as new biologics that modulate target function *in vivo*

ABSTRACT

Background and Purpose: The pro-inflammatory ATP-gated P2X7 receptor is widely expressed by immune and non-immune cells. Nanobodies targeting P2X7, with agonistic or antagonistic effects, have been developed. AAV-mediated gene transfer represents an efficient approach to achieve long-term *in vivo* expression of selected nanobody-based biologics. Such approach (AAVnano) was used to validate the relevance of P2X7 as a target in DSS-induced colitis in mice.

Experimental Approach: Mice received i.m. injection of AAV vectors coding for agonistic (14D5-dimHLE) or antagonistic (13A7-Fc) nanobody-based biologics targeting P2X7. Long-term modulation of P2X7 activity was evaluated *ex vivo* from blood samples. Colitis was induced with DSS in mice injected with AAV vectors coding for the nanobody-based biologics. Severity of colitis, colon histopathology and expression of chemokines and cytokines were determined to evaluate the impact of P2X7 modulation.

Key Results: A single injection of AAV vector coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE efficiently modulated P2X7 function *in vivo* from day 15 onwards and until 120 days post-injection in a dose-dependent manner. AAV vector coding for 13A7-Fc significantly ameliorated DSS-induced colitis and significantly reduced immune cell infiltration and expression of chemokines and proinflammatory cytokines in colonic tissues.

Conclusion and Implications: We demonstrate the validity of the AAVnano methodology to modulate P2X7 functions *in vivo*. Applying this method to the DSS-induced colitis model, we demonstrate that P2X7 blockade reduces inflammation and disease severity. Hence, this study confirms the importance of P2X7 as a pharmacological target and suggests the use of nanobody-based biologics as potential therapeutics in inflammatory bowel disease.

1. INTRODUCTION

Purine nucleotides released into the extracellular compartment, such as extracellular ATP (eATP), can act as potent signalling molecules that regulate several physiological processes, including immune responses. Whereas eATP levels remain low in homeostatic conditions, eATP concentrations rapidly increase in situations of cell stress or cell damage. eATP can then act as a danger associated molecular pattern (DAMP) engaging an immune response. Indeed, eATP has recently emerged as a key signalling molecule mediating different aspects of innate and adaptive immunity (Kepp, Loos, Liu, & Kroemer, 2017; Rissiek, Haag, Boyer, Koch-Nolte, & Adriouch, 2015). Notably, eATP acts through the purinergic P2X7 receptor, a ligand-gated ion channel of the purinergic type 2 receptor (P2R) family (Schwarz et al., 2009). P2X7 is widely expressed by lymphoid and myeloid immune cells (Bours, Swennen, Di Virgilio, Cronstein, & Dagnelie, 2006). On murine T lymphocytes, P2X7 activation induces metalloprotease-mediated shedding of CD62L (Gu, Bendall, & Wiley, 1998; Hubert et al., 2010; Moon, Na, Chong, & Kim, 2006; Rissiek et al., 2015; Scheuplein et al., 2009) and CD27 (Moon et al., 2006), and leads to regulatory T cell (Treg) death (Hubert et al., 2010; Rissiek et al., 2015). On myeloid cells such as macrophages and dendritic cells, gating of P2X7 drives activation of the NLRP3 inflammasome, caspase-1 and gasdermin D, and the subsequent maturation and release of mature IL-1 β and IL-18 proinflammatory cytokines (Hong et al., 2009; Mitra & Sarkar, 2019; Pelegri, 2021; Schwarz et al., 2012).

Ample evidence suggests a role of eATP in the pathogenesis of inflammatory diseases including inflammatory bowel disease (IBD). P2X7 is expressed on immune and non-immune cells of the gastrointestinal tract (Cesaro et al., 2010; Heiss et al., 2008; Trautmann, 2009). Up-regulated P2X7 expression has been reported in the

colon epithelium and in the lamina propria (macrophages and dendritic cells) of Crohn's disease patients (Neves et al., 2014). Similarly, up-regulated expression of P2X7 has been reported in rats subjected to the acute model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis (Saber et al., 2021). Conversely, P2X7-deficient mice exhibit reduced mucosal inflammation in both, DSS and trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced models of colitis (Hofman et al., 2015; Neves et al., 2014). These findings agree with the purported proinflammatory roles of P2X7, and supports its role in the development of intestinal inflammation. Moreover, these findings suggest that targeting P2X7 may constitute a therapeutic target in inflammatory diseases such as IBD. Despite the development of several small-molecule P2X7 inhibitors (Illes et al., 2021), their use may be hampered by their low specificity, their side effects, and their short half-life *in vivo* due to their metabolism into inactive by-products.

Antibodies constitute important tools for experimental research and therapy. Most antibodies are composed of two heavy and two light chains and both chains contribute to the antigen-binding site. Remarkably, llamas and other camelids can also produce antibodies composed of only heavy chains (Muyldermans, 2013). The single antigen-binding domain of these antibodies is designated V_HH or, when produced as a recombinant protein, nanobody (Nb) or single domain antibody. Nanobodies that block (13A7) or activate (14D5) gating of the P2X7 ion channel have been developed (Danquah et al., 2016; Koch-Nolte et al., 2019). The efficacy of these nanobodies *in vivo* has been demonstrated, since systemic injection of recombinant 13A7-based biologics in mice blocked P2X7 activation on T cells and macrophages and ameliorated experimental glomerulonephritis and allergic contact dermatitis (Danquah et al., 2016). Yet, injections every three days were necessary to maintain effective concentrations of the nanobody in blood. Here, we report an alternative adeno-associated virus (AAV)-

based methodology as a delivery vector for the *in vivo* gene transfer of DNA sequences coding for selected P2X7-targeting nanobody-based biologics. With this strategy, termed AAVnano, we screened directly *in vivo* for the best nanobody-based biologic candidates, while maintaining an ideal bioavailability overtime, with the aim to validate P2X7 as a potential pharmacological target. Using the AAVnano methodological approach, we were able to ensure the continuous presence of efficient concentrations of the evaluated nanobody-based biologics *in vivo*, even in the long-term, until at least 120 days post AAV administration. We first identified and characterized AAV vectors coding for nanobody-based biologics able to either block or potentiate P2X7 function. One AAV was selected for its capacity to potently and durably inhibit P2X7 (i.e., coding for 13A7-Fc biologic), and one for its capacity to potentiate P2X7 functions *in vivo* (i.e., coding for 14D5-dimHLE biologic). This approach offers the unique opportunity to directly modulate P2X7 functions *in vivo*, in different pathophysiological situations, and in any given mouse genetic background (contrary to genetically-manipulated animals). Also, this is no need to perform repeated small-molecule injections for which the pharmacokinetic profile and the bioavailability are not always sufficiently characterized. In addition, this approach allowed not only to inhibit P2X7 (i.e., using AAV-13A7-Fc), a frequent aim of published studies, but also to potentiate its function (i.e., using AAV-14D5-dimHLE) which may aggravate the disease and thus confirms indirectly the implication of P2X7 in a given pathophysiological process. More specifically, we aimed to evaluate P2X7 contribution to the pathological inflammatory condition induced by dextran sodium sulfate (DSS) administration, as a model of inflammatory colitis. In this model, we demonstrated that a single injection of AAV-13A7-Fc significantly reduced DSS-induced colitis, and inhibited immune cell infiltration and production of inflammatory cytokines. In conclusion, our data validated the AAVnano methodological

approach to study P2X7 contribution *in vivo* and, more importantly, confirms the relevance of P2X7 as a pharmacological target. Additionally, our study suggests that a therapeutic strategy using nanobody-based biologics to target P2X7 may be beneficial for the treatment for IBD, and potentially other chronic inflammatory diseases.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animal experiments

8-week-old C57BL/6JRj female mice (Janvier Labs) were used in these studies. Mice were maintained in conditions of constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) under a controlled 12-h/12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM). Mice were housed in groups of five mice per cage with *ad libitum* access to food and water. The animal experimental protocols were approved by the French Ministry of Education and Research, after consultation of the ethical committee (n° APAFIS#8172). Animal studies are in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the British Journal of Pharmacology (Lilley et al., 2020). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals. Concerning the DSS model of colitis, animals were checked daily for signs of suffering and were euthanized if weight loss was $>20\%$, or if hunching posture, shivering, lack of movement or cold temperature were observed. Mice were sacrificed by cervical dislocation. For our DSS experiments, group size of 10 mice ($n=10$) were selected based on our previous experience (Nemetz et al., 2008), to ensure a statistical significance considering the biological variability of disease development and possible loss of mice due to over 20% weight loss. For all experiments, mice were randomly assigned to the different groups of treatments. For DSS experiments, each cage contained mice from each treatment group (PBS, 13A7-Fc, and 14D5-dimHLE) in order to avoid confounding effects due to variability among cages.

2.2 Generation of the AAV vectors coding for the nanobody-based biologics

The construct 14D5-dimHLE used in this study was based on a nanobody dimer (“dim” format) fused to the Alb8 anti-albumin nanobody (half-life extended “HLE” format). For

that, the coding sequences corresponding to two 14D5 nanobodies were fused using a 35-GS linker (GGGGS)₇. This construct was further fused to the anti-albumin nanobody Alb8 *via* a 9-GS linker (GGGGSGGGS) (Danquah et al., 2016). The P2X7-blocking 13A7-IgG1 hcAb was constructed by fusing the sequence corresponding to the nanobody 13A7 to the hinge and Fc regions of a mutated mouse IgG1 antibody carrying the “LSF” mutations (T252L, T254S, T256F) (Scheuplein et al., 2010) described previously to confer higher affinity to the neonatal Fc receptor (FcRn) and thereby an extended half-life *in vivo* (Ghetie et al., 1997).

For the production of AAV, all constructs were cloned into a pFB plasmid under the control of a CBA promoter (for AAV1 constructs coding for 14D5-dimHLE and 13A7-Fc). Production, purification, and titration of AAV1 were performed by Virovek (Hayward, California, USA) using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells. For muscle transduction, mice hind legs were shaved under ketamine/xylazine anesthesia and 100 µL diluted AAV were injected into four gastrocnemius or quadriceps muscle sites (25 µl per injection site) to reach a total dose of 10¹¹ viral genomes (vg) per mouse.

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

Evaluation of the agonistic or antagonistic potential of each nanobody was determined *ex vivo* using a functional assay based on ATP-induced and P2X7-depend shedding of CD62L or/and CD27 at the surface of lymphocytes (Scheuplein et al., 2009). Briefly, blood samples were collected from the retroorbital sinus in EDTA-containing tubes, and peripheral blood mononuclear cells were treated with or without ATP (at doses ranging from 30 to 600 µM, depending on the study) in PBS for 15 min at 37°C. For

some studies, similar experiments were performed with splenocytes obtained at the study endpoint after collection and preparation of splenocytes and filtration through a 40 µm cell-strainer. After incubation with ATP, cells were washed with PBS containing 3% FBS and stained with a cocktail of directly labelled antibodies containing anti- CD4-APC-Cy7, CD25-PE, CD8a-PE-Cy7, CD62L-FITC, CD27-APC. Cells were incubated with antibodies for 30 min at 4°C, washed with PBS with 3% FBS. Erythrocyte lysis and cell fixation were performed simultaneously by incubation with RBC Lysis/Fixation Solution (Sony Biotechnology) for 30 min at room temperature, before washing and analysis by flow cytometry using an LSRFortessa (BD Biosciences).

2.4 Titration of the nanobody-based biologics produced *in vivo*

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

obtained after serial dilution of the same recombinant construct obtained and purified from transiently transfected HEK-293 cells.

2.5 Colitis induction following administration of dextran sodium sulfate

Mice (n=10/group) received an i.m. injection of either PBS, 10^{11} vg of AAV-13A7-Fc, or 10^{11} vg of AAV-14D5-dimHLE. Mice were randomized for treatment. Three weeks later, acute inflammation was induced by administration of 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) in the drinking water from days 1 to 5, after which they were switched to regular water. For the chronic DSS model, mice were given three cycles of 2.5% DSS for five days followed by 15 days of water. The disease activity index (DAI), was evaluated on a daily basis by two independent researchers blinded to the treatment, following a scoring system from 0 to 10, as reported previously (Hofman et al., 2015). DAI was calculated by the addition of three different clinical scores: (1) body weight loss, which was scored from 0 to 4 (0, no loss; 1, loss < 5%; 2, loss < 10%; 3, loss < 20%; 4, loss > 20%); (2) stool consistency, from 0 to 3 (0, normal; 1, loose stools; 2, watery diarrhea; 3, severe watery diarrhea); (3) presence of rectal bleeding, from 0 to 3 (0, no blood; 1, presence of petechia; 2, traces of blood in the stools; 3, bleeding). Mice were sacrificed on day 13, and colons, mesenteric lymph nodes and spleens were collected for further mechanistic studies. Colons were washed and divided in three portions as follows: starting from the proximal colon, 0.5 cm of tissue was collected for RNA studies, the next 0.5 cm for explant cultures, and the rest was rolled using the “Swiss Roll” technique and fixed overnight in 4% paraformaldehyde for histological studies.

2.6 Histopathological evaluation

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

2.7 Real time RT-PCR

RNA was isolated from colons with Trizol reagent (Sigma) and retrotranscribed with the ImProm-IITM transcription system from Promega. Real time quantitative PCRs were performed using the Lightcycler 480 SYBR Green I Master (Roche). Primers are listed in Supplementary Table 1. Amplification was performed with a LightCycler 480 System SW 1.5.1 (Roche) as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 30 s followed by 60°C (for CCL2, CXCL9, IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-22 and TGF β) or 62°C (for CXCL10) for 30 s, and 72°C for 30 s. Melting curve analysis confirmed primer specificity. The calculation was normalized to the housekeeping gene Eef2 according to the formula $(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}}}/(E_{\text{normalizer}})^{\Delta C_{\text{t normalizer}}}$. Data were normalized with respect to DSS PBS-injected controls (100% expression) in order to correct for variation between experiments.

2.8 Colon explant cultures

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

2.9 Data and statistical analyses

The data and statistical analyses comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). Data are presented as mean \pm SEM. Two-Way ANOVA with *Dunnett's* multiple comparisons *post hoc* tests was used for statistical analysis of DAI curves. Comparisons between groups were performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons *post hoc* tests. For all, the threshold for statistical significance was set at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software Inc., USA).

3. RESULTS

AAVnano methodology to evaluate *in vivo* different nanobody-based biologics designed to modulate P2X7 functions

Different nanobodies targeting P2X7 have been generated that exhibit the ability to block or to potentiate P2X7 functions (Danquah et al., 2016). We selected three nanobody clones that have previously demonstrated an antagonist effect *in vitro* (*i.e.*, clones 13A7, 1c81 and, 8G11) and one clone with a potentiating activity (*i.e.*, clone 14D5); patent WO2013178783A1 (Danquah, Koch-Nolte, Stortelers, & Toon, 2013). As a first step, we aimed to select among these clones the nanobody-based biologics offering the highest capacity to inhibit, or conversely to potentiate, P2X7 functions *in vivo*. Nanobodies display a limited *in vivo* persistence due to their small size and the lack of an Fc-region that mediates half-life extension through the neonatal Fc receptor (FcRn). We thus generated two types of construct to increase their half-life and their avidity to the target. In one construct, we fused the selected nanobody to the hinge and Fc regions of a variant of mouse IgG1 carrying the “LSF” mutations (T252L, T254S, T256F), which were shown to confer a higher affinity to FcRn (Danquah et al., 2016; Demeules et al., 2020). In the second construct, we dimerised the selected nanobody and further fused the construct to an albumin-specific nanobody (Alb8), conferring half-life extension by binding to albumin (Danquah et al., 2016; Demeules et al., 2020). The corresponding genetic sequences coding for these two types of construct, termed respectively nano-Fc or nano-dimHLE, were used to generate recombinant AAV vectors coding for the nanobody-based biologics of interest (**Fig. 1A**).

In a first screening phase, we evaluated *in vivo* four different AAVs, each coding for a different nano-Fc construct targeting P2X7 (*i.e.*, 13A7-Fc, 14D5-Fc, 1c81-Fc and 8G11-Fc). For that, AAVs were administrated i.m. at a dose of 10^{11} vg/mouse, and the

functional consequences of the nano-Fc biologics produced *in vivo* were evaluated. As a robust and sensitive readout of P2X7 activity, we used its known effect on metalloprotease-mediated release of CD62L from the surface of peripheral blood T cells (Hubert et al., 2010; Scheuplein et al., 2009). Blood samples were collected 2 weeks post AAV injection, treated with ATP *ex vivo*, and P2X7-dependant shedding of CD62L was evaluated by flow cytometry in CD8⁺, CD4⁺ and Treg (CD4⁺CD25⁺) cell subsets. The results indicate that AAVs coding for 13A7-Fc or 1c81-Fc efficiently block P2X7 activity, while the AAV coding for 8G11-Fc was associated with partial inhibition (**Fig. 1B**).

Unexpectedly, while nanobody 14D5 was formerly found to potentiate P2X7 receptor activity (Danquah et al., 2016), the 14D5-Fc construct evaluated here did not show a potentiating effect, but instead showed a weak antagonistic activity possibly due to steric hindrance (**Fig. 1B**).

We next evaluated whether a construct based on the nano-dimHLE format could better preserve the potentiating effect observed *in vitro* with the original 14D5 nanobody. We thus generated an AAV vector coding for 14D5-dimHLE as well as, for comparison, a vector coding for 13A7-dimHLE. Mice were injected with the different AAV vectors and blood samples were collected 2 weeks later for evaluation of P2X7 function *ex vivo* on T cells. The results show that the AAV vector coding for the 13A7-Fc construct blocks P2X7 function more extensively than the new one coding for 13A7-dimHLE, suggesting that the format indeed influences the potency *in vivo*. The data also revealed that the AAV vector coding for 14D5-dimHLE indeed exerts a potentiating effect on P2X7 activity, as initially aimed (**Fig. 1C**). However, as the chosen dose of 150 μ M ATP already represents a near saturating dose in our sensitive assay, the potentiating effect of 14D5-dimHLE was barely visible in this condition. To

better evaluate this point, we repeated the experiment to include a lower dose of 30 μM ATP and analysed the shedding of CD62L and CD27 in CD8⁺, CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells subsets. As expected, the potentiating effect was now evident on all analysed T cell subsets, including on CD8⁺ T cells that express lower levels of P2X7 (Adriouch et al., 2007; Seman et al., 2003) and are less sensitive than the CD4⁺ subsets (**Fig. 2 A-B**). Thus, these data suggest that P2X7 activation *in vivo* would be facilitated by 14D5-dimHLE at low ATP concentrations after i.m. administration of the corresponding AAV vector, AAV-14D5-dimHLE.

Collectively, based on these results we selected AAV-13A7-Fc as the most potent AAV vector to suppress P2X7 function *in vivo* and AAV-14D5-dimHLE as the most potent AAV vector to potentiate P2X7 at low ATP concentrations.

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

Next, we evaluated the dose-response of our AAVnano methodology. For that, we focused here on the AAV-13A7-Fc vector as complete inhibition of P2X7 function requires a saturating dose of the nanobody-based biologics, while partial versus full potentiation is more difficult to distinguish. With that aim, different doses ranging from 3.7×10^9 vg to 1×10^{11} vg per mouse of AAV-13A7-Fc were injected i.m. and blood samples were collected 2 weeks later to evaluate ATP-induced shedding of CD62L from the surface of CD4⁺ T cells as previously. The results demonstrate that almost complete blockade of P2X7 function can be achieved at vector doses above 3.3×10^{10} vg/mouse (**Fig. 3**). To confirm and extend these results, a similar experiment was performed at a later time point (12 weeks post-AAV injection) to evaluate the durability of P2X7 blockade *in vivo*. Here we included higher doses of ATP and extended the

analyses to CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. The results confirm the initial dose-response profile, with a near complete P2X7-blockade at AAV-doses above 1x10¹⁰ vg/mouse (supplementary **Fig. S1 + S2**). Remarkably, we observed that both, the CD8⁺ and CD4⁺ T cells collected from AAV-13A7-Fc injected mice were resistant to very high ATP concentrations (*i.e.*, up to 600 μM), confirming the high level of P2X7-inhibition obtained with our AAVnano methodology. Based on the results of this dose-response study, we chose to inject the saturating dose of 1x10¹¹ vg AAV per mouse in all subsequent studies.

Evaluation of the kinetics of production *in vivo* of the nanobody-based biologics and of their P2X7-modulating effects following a single injection of AAVnano

To better characterize our AAVnano methodology, we further determined the effects of 13A7-Fc and 14D5-dimHLE over time. For that, the corresponding AAV vectors were injected *i.m* at a dose of 10¹¹ vg/mouse, and blood samples were collected at different time points to evaluate *ex vivo* the effect of each construct on the activity of P2X7 on the surface of circulating T cells. The blocking potential of 13A7-Fc nanobodies was evaluated and compared to ATP-untreated T cells collected from untransduced control mice. The results confirm a complete blockade of P2X7 at all time points analysed, suggesting a durable effect of the antagonistic nanobody-based biologics *in vivo* (**Fig. 4A**, left panel). For further confirmation of the potent blocking effect of AAV-delivered 13A7-Fc biologics on P2X7 function, we also performed comparisons with cells obtained from P2X7^{-/-} mice. For that, mice were euthanized 120 days post AAV-injection and splenocytes were collected. The cells were treated *ex vivo* with 150 μM ATP and P2X7 activity was evaluated on these cells and compared

with splenocytes collected from P2X7^{-/-} mice. The results demonstrate that the functional inhibition of P2X7 obtained 120 days post AAV-13A7-Fc is similar to that observed with cells from P2X7-deficient mice (**Fig. S3**).

We also evaluated the potentiating effect of 14D5-dimHLE overtime on P2X7 function. At some time points (*i.e.*, 17, 87, and 107 days post AAV-injection), cells were treated with a dose of 150 μ M ATP, while for some time points (*i.e.*, 21 and 87 post AAV-injection) cells were also treated with a lower dose of 30 μ M ATP to evaluate the increase in sensitivity to lower ATP concentrations. The results show that the effect of 14D5-dimHLE on the activity of P2X7 is barely visible in the experimental setting using 150 μ M ATP (**Fig. 4A**, middle panel). However, a potentiating effect is clearly evidenced at the lower dose of 30 μ M ATP (**Fig. 4A**, right panel). This confirms the previous data and suggests that 14D4-dimHLE mediates a 3 to 6 fold increased sensitivity to low ATP concentrations.

Next, we evaluated the kinetics of production of the nanobody-based biologics *in vivo* upon a single administration of the corresponding AAV vector. For that, 10¹¹ vg/mouse of AAV-13A7-Fc or AAV-14D5-dimHLE were injected i.m. and sera were collected over time for more than 100 days. The concentration of unbound nanobody-based biologics in these samples was evaluated using a flow cytometric assay. For that, a P2X7-expressing cell line was used to capture the nanobody-based biologics contained in the diluted serum, and the respective nanobody concentration was determined by comparison with a standard titration curve. The results reveal that nanobody-based biologics reach concentrations of ~30 μ g/ml at day 17 post AAV injections. Concentrations subsequently increase over time to reach a plateau at ~ 100 μ g/ml between days 30 to 60 that is maintained over time until experiment termination (**Fig. 4B**). These data are well in agreement with the notion that the AAVnano

methodology leads to a continuous production of the nanobody-based biologics for several months *in vivo*, with relatively constant pharmacokinetics, contrasting with what is usually obtained using repeated injections of recombinant biologics.

Importantly, no conspicuous changes were noticed in the frequency of T cell subsets overtime in the different AAV-injected groups, suggesting that the nanobody-based biologics evaluated here do not induce depletion of the target cells (not shown). Of note, even if we only use a unique assay to evaluate here P2X7 activity (*i.e.*, a sensitive assay based on the shedding of CD27/CD62L on T cells), we previously demonstrated that the same constructs similarly modulate other hallmarks associated with P2X7 functions, in lymphoid as well as myeloid cells, such as membrane depolarisation, calcium influx, pore formation, NLRP3 oligomerisation, or IL-1 β release (Danquah et al., 2013; Danquah et al., 2016; Demeules et al., 2020). Also, we recently found that AAV-13A7-dimHLE also inhibits P2X7-dependant pore formation and IL-1 β release in microglial cells *in vivo* across the blood-brain-barrier (manuscript in preparation).

Hence, these data collectively indicate that nanobody-based biologics expressed *in vivo* following AAV-mediated gene transfer are well tolerated, durably expressed, and potently modulate (*i.e.*, block or potentiate) P2X7 functions *in vivo*.

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

P2X7 participates in the inflammatory response by activating the NLRP3 inflammasome that leads to caspase-1 activation and IL-1 β and IL-18 maturation and release. In order to investigate the ability of AAV-13A7-Fc and AAV-14D5-dimHLE to

modulate inflammation *in vivo*, we used the model of acute colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). This *in vivo* experimental system in rodents recapitulates multiple aspects of the human IBD at clinical, microscopic and molecular levels (Eichele & Kharbanda, 2017). Mice received a single i.m. injection of AAVnano coding for the nanobody-based biologics, and three weeks later they were given 2.5% DSS in the drinking water for five days followed by eight days of regular water. We observed that the disease activity index (DAI) progressively increased upon DSS administration in both untreated and treated mice until day 7 post-DSS treatment, with no difference among groups (**Fig. 5A**). Remarkably, after this time point the DAI of AAV-13A7-Fc treated mice remained significantly lower compared to PBS- or AAV-14D5-dimHLE-treated mice. Mice injected with AAV-14D5-dimHLE exhibited a trend toward an enhanced disease as compared to untreated mice that did not reach statistical significance, possibly reflecting an already very high level of inflammation. Comparing the three groups of mice, the cumulative DAI score from day 8 was 10.85 ± 2.29 in AAV-13A7-Fc treated mice vs 16.75 ± 3.02 in control mice and 18.90 ± 2.40 in AAV-14D5-dimHLE treated mice. In correlation with the clinical data, a reduction of colon length and signs of inflammation (redness and swelling) were macroscopically observed in PBS-treated mice upon 13 days of DSS administration, which were ameliorated by the AAV-13A7-Fc treatment and slightly worsened by AAV-14D5-dimHLE (**Fig. 5B**). At microscopic level, colons from DSS-treated mice exhibited mucosal and submucosal immune cell infiltration and focal crypt damage with goblet cell loss (**Fig. 5C**). These histopathological features of intestinal inflammation were significantly reduced in AAV-13A7-Fc-injected mice. Indeed, the average histopathological score was 3.75 ± 0.79 for PBS-treated mice vs 1.63 ± 0.32 for AAV-13A7-Fc-treated mice (**Fig. 5C**). AAV-14D5-dimHLE treatment did not significantly worsen this score, with nonetheless a

trend to be higher than in untreated mice (4.4 ± 1.11). Notably, protective effects of AAV-13A7-Fc on clinical and histopathological scores were observed even when a higher dose of DSS (3%) was used, suggesting that even higher levels of inflammation could be treated using biologics that block the P2X7 pathway (supplementary **Fig. S4**).

In addition to the model of acute colitis induced by DSS, we used a chronic model based on the administration of several cycles of DSS/water (*i.e.*, here three cycles of 2.5% DSS given for five days, followed by 15 days of regular water), and studied the effect of a single AAVnano injection on the clinical development of the disease (**Fig. 6**). As above, we observed a significant effect on the average clinical score during the first cycle of DSS-treatment, with a reduction in the case of 13A7-Fc and an increase for 14D5-dimHLE. The second cycle of DSS-treatment was less informative and only induced a 1.5- to 2-fold increase in the clinical scores, possibly because inflammation induced by the first DSS treatment was not yet resorbed at the end of the first cycle. Nevertheless, the responses to the third cycle of DSS were of higher amplitude and we observed that the disease reduction induced by AAV-13A7-Fc and the increase by AAV-14D5-dimHLE treatments persisted (**Fig. 6**). This suggests that targeting P2X7 by nanobody-based biologics leads to efficient P2X7 modulation even in the context of chronic inflammation.

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

As a readout of the ability of our AAVnano strategy to modulate P2X7 activity before and after disease induction, we evaluated the shedding of CD27 and CD62L on peripheral blood lymphocytes from AAV-13A7-Fc and AAV-14D5-dimHLE injected mice, induced by exposure to 150 μ M ATP *ex vivo*. In PBS-injected mice, ATP

treatment dramatically reduced the percentage of CD62L⁺CD27⁺ cells within the CD4⁺, CD8⁺ and Treg (CD4⁺CD25⁺) populations compared to cells not exposed to ATP (**Fig. 7A**). As expected, lymphocytes from AAV-13A7-Fc-injected mice were protected from ATP-induced shedding of CD27 and CD62L, in agreement with our previous experiments. Importantly, this protective effect was maintained after DSS-treatment suggesting that the *in vivo* production of 13A7-Fc biologics is not affected by the intense inflammatory status induced by DSS administration (**Fig. 7A**). To further validate this point, we evaluated the concentration of the 13A7-Fc biologics in the sera collected from the DSS-treated animals. Data confirmed that the concentrations of unbound 13A7-Fc found in the circulation were maintained above 30 µg/ml and were not significantly affected by DSS-treatment (**Fig. 7B**). As to the situation concerning the functional effect and the concentration of the 14D5-dimHLE biologics, our data confirmed a slightly potentiating effect of this biologics in the experimental condition used, and an even higher production of this biologics in the circulation over time, even after DSS treatment (**Fig. 7A-B**).

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

DSS induces intestinal inflammation through the disruption of the intestinal epithelium, enabling the entry of luminal bacteria and associated antigens into the mucosa leading to an inflammatory response (Eichele & Kharbanda, 2017). Immune cells, recruited by means of locally produced chemokines, produce a wide range of proinflammatory mediators amplifying the immune response and leading to tissue damage. Indeed, expression of the chemokines CXCL9, CXCL10 and CCL2 and the proinflammatory cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 and IL-22 in colon tissue was significantly elevated in DSS-treated mice compared to untreated mice (**Fig. 8A**). In

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

P2X7 promotes inflammation by activating the NLRP3-inflammasome, and participates thereby not only in the maturation of IL-1 β and IL-18 that occurs in the cytoplasm, but also in their release to the extracellular compartment. Therefore, we also evaluated the levels of these cytokines, at the protein level, in culture supernatants of colon explants. In agreement with P2X7 inhibition and amelioration of the disease, we observed a reduction in the level of these cytokines in AAV-13A7-Fc injected mice as compared to the PBS control group that reached statistical significance for IL-18 (**Fig. 8B**).

4. DISCUSSION

Recombinant AAV vectors represent an efficient means to produce therapeutic proteins *in vivo*, both in animal models as well as in humans (Colella, Ronzitti, & Mingozzi, 2018). Transgenes transferred using AAV vectors persist for months in episomal form (*i.e.* unintegrated extrachromosomal form), considerably limiting the risk of mutational insertion as compared to other types of vectors. Additionally, their lack of pathogenicity, their physical stability and their ability to infect nondividing cells, render AAV vectors ideal for efficient gene transfer in animal models and in the clinic. Compared to other viral vectors, AAV vectors are less immunogenic than adenovirus vectors, are as easily produced and titrated as lentivirus vectors and - as non-pathogenic and non-replicative dependoviruses - are safer to manipulate than adenovirus or lentivirus vectors. Additionally, a variety of capsid serotypes offer the possibility to selectively target tissues of interest. For instance, AAV1 displays a high transduction efficiency and tissue selectivity for skeletal muscle, AAV8 for muscle and liver, and AAV9 for brain. It was previously shown that AAV-mediated gene transfer into muscle can be used to induce the systemic secretion of broadly-neutralizing antibodies against the human immunodeficiency virus (HIV), thereby protecting humanized-mice against HIV infection (Balazs, Bloom, Hong, Rao, & Baltimore, 2013; Brady, Baltimore, & Balazs, 2017). This approach, named “vectored immunoprophylaxis” (VIP), induced the appearance and persistence (for months) of anti-HIV antibodies in the circulation of mice that had received a single *i.m.* injection of AAV1 vector coding for the selected antibody. A second study confirmed the efficiency and feasibility of the VIP strategy to confer durable protection also against influenza infection in mice (Balazs et al., 2013). Here, we adapted this methodology to induce long-term expression of nanobody-based biologics, selected for their remarkable ability

to either fully block (13A7-Fc), or to potentiate (14D5-dimHLE), P2X7 functions *in vivo*. We demonstrate that AAV1-mediated gene transfer into muscle cells, following a single i.m. injection of the given AAVnano vectors, is sufficient to drive effective expression of nanobody-based biologics *in vivo* and to modulate P2X7 functions in a time frame ranging from 2 weeks to at least 4 months post AAV-injection. We propose that this AAVnano methodology is not only valuable for validating the importance of P2X7 as a target in a variety of pathophysiological contexts, but also for screening different formats of nanobody-based biologics for clinical development. Interestingly, a recently described humanized P2X7 receptor knock-in mouse model has been generated, that may be useful for such a screening strategy (Metzger et al., 2017), e.g. of available functional nanobodies against human P2X7 (Danquah et al., 2016).

Whereas healthy tissues contain minimal levels of extracellular nucleotides and nucleosides, their levels increase in certain conditions such as hypoxia, ischemia, inflammation, or cancer. In this sense, it has been reported that eATP is released in colon tissues during DSS-induced colitis in mice (Wan et al., 2016). Indeed, it was shown that the levels of eATP progressively increase from day 3 upon treatment with 4% DSS, with the highest levels on day 7. Interestingly, we started to observe a protection from DSS-induced disease at a clinical level by AAV-13A7-Fc only from day 7 onwards, which correlates with the period when the highest concentrations of eATP were detected. In the same study, Wan *et al* demonstrated that blockade of ATP release by carbenoxolone (CBX), or promoting ATP degradation by a potent ATPase (apyrase), reduced eATP levels in the colon and attenuated DSS-induced colitis (Wan et al., 2016). Conversely, tissue damage in mice with colitis was exacerbated by the inhibition of eATP degradation by sodium metatungstate (POM-1, a known inhibitor of ecto-nucleotidases). This supports the hypothesized role of eATP in the pathogenesis

of DSS-induced colitis in mice, and suggests a role for P2X7. In a different study, the potential therapeutic effect of P2X7 blockade in rat DSS-induced colitis was evaluated using Brilliant Blue G (BBG), a widely used non-peptidic P2X7 antagonist (Saber et al., 2021). BBG ameliorated colitis induced by DSS, restoring colonic macroscopic and microscopic morphology. This effect was accompanied by reduced expression of Myd88, NF- κ B, IL-6, TNF- α and P2X7. In addition, BBG reduced NLRP3 inflammasome activation, subsequent caspase-1 activation and IL-1 β and IL-18 release. The combined administration of OLT1177, a NLRP3 inhibitor, with BBG potentiated its inhibitory effect on NLRP3, caspase-1, IL-1 β and IL-18 levels. Using another model of colitis, other authors reported that intraperitoneal administration of BBG significantly reduced the inflammatory response in the colon of rats treated with TNBS (Marques et al., 2014). Although these are interesting results suggesting the involvement of P2X7 in the pathogenesis of inflammatory colitis, the specificity of BBG has been questioned, as data has shown that BBG can also antagonize P2X1, P2X2, P2X3, and P2X4 receptors to some extent, as well as voltage-gated sodium channels (Jo & Bean, 2011). In addition, compared to our approach, where a single injection of AAV-13A7-Fc was sufficient to obtain high nanobody-based biologics concentrations in the serum and significant therapeutic effects, BBG was administered either every day (Saber et al., 2021), or before and three days after colitis induction (Marques et al., 2014). A recent study has also reported the development of novel pyroglutamide-based P2X7 antagonists, with two compounds exhibiting beneficial effects in the DSS-induced colitis model. Although these are all promising results, small drugs were administered on a daily basis (Homerin et al., 2020), whereas nanobody-based biologics represent an alternative single therapeutic treatment that offer target specificity as well as longer half-life *in vivo*.

Our data demonstrates that our AAVnano methodology (*i.e.*, AAV coding for nanobody-based biologics) could be used to either inhibit or potentiate P2X7 activity *in vivo*. Their i.m. administration modulate inflammation *in vivo*, consequently leading to an amelioration or an increase of DSS-induced colitis, respectively. This modulation could be observed three weeks after AAVnano injection in acute inflammatory conditions induced by one cycle of DSS treatment (**Fig. 5**). Moreover, consistent with an efficient long-term modulation of P2X7 *in vivo*, our results obtained after one cycle of DSS were recapitulated in the chronic model of colitis after three cycles of DSS (**Fig. 6**). Interestingly, these effects were observed during the third but not the second cycle of DSS. However, the second cycle was initiated before disease resolution from the first cycle and resulted in limited increase in the clinical scores during the second DSS treatment. A milder disease to a second DSS exposure has also been reported in other studies (Berry et al., 2015; Chen, Wang, Li, Huang, & Ma, 2018; Wetzel, Scholtka, Gerecke, & Kleuser, 2020). This difference of sensitivity to the first and second cycles of DSS may be related to the kinetics of epithelial mucosa healing after the first DSS exposure. Indeed, in the AAV-13A7-Fc group where healing after the first cycle was faster, we observed a slightly higher clinical response to the second DSS cycle that however remained of lower intensity compared to the amplitudes reached after the first and third DSS treatments. Interestingly, although not specifically addressed in the present study, P2X7 itself may also be implicated in the healing phase where epithelial cell proliferation contributes to the reestablishment of the intestinal barrier. In a previous study, we observed that P2X7 blockade enhanced proliferation of intestinal epithelial cells and protected them from apoptosis (Hofman et al., 2015). The accelerated recovery in AAV-13A7-Fc-treated mice might have reconstituted intestinal homeostasis faster than that in untreated mice, therefore restoring a partial sensitivity

to the second DSS treatment. In such a scenario, P2X7 blockade in the context of colon inflammation may not only contribute to the reduction of inflammasome activation and the production of pro-inflammatory cytokines by immune cells, but may also foster a faster restoration of the epithelial barrier, thereby limiting perpetuation of the inflammatory process.

5. CONCLUSIONS

In summary, our data demonstrate that nanobody-based biologics can be produced *in vivo* following a single i.m. administration of AAV vectors *in vivo* for several months without conspicuous side effects. Using this strategy to express nanobody-based biologics targeting P2X7, we demonstrated beneficial effects of a P2X7-blocking biologic on DSS-induced colitis, with a reduction of clinical symptoms, colon histopathology as well as reduced expression of chemokines and proinflammatory cytokines. Our results highlight the beneficial role of P2X7 blockade in both acute and chronic inflammatory conditions, which may apply also to other disease models. Moreover, the P2X7-blocking/potentiating strategy explored here represents a valuable novel approach for assessing the role of P2X7 in a variety of inflammatory diseases as well as other pathophysiological contexts where P2X7 is suspected to play an important role, ranging from cancer, autoimmune to neurodegenerative diseases. In the context of intestinal inflammation, our data validate the beneficial role of P2X7-inhibition and suggest that nanobody-based biologics represent a novel class of pharmacological drugs with high potency and selectivity that may complement the already available therapeutic strategies.

6. Funding

The present work was funded by a grant No 2015-137 from *Institute National du Cancer* (INCa) to CA, VVC, and SA, by a grant No ANR-18-CE92-0046-01 from *Agence National de la Recherche* (ANR) to SA, and by grant No 310/13 from the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (DFG) to FKN.

7. Acknowledgements

The authors would like to thank Marine Blandin, Gaetan Riou, Laetitia Jean, and Chantal Barou for excellent technical assistance.

8. Authorship

CA, VVC, FKN and SA conceived and design the study. CA, MD, CG, YVT, VVC, CPE, FKN and SA developed the methodology. All authors contributed to the planning, acquisition of data, or to the interpretation of the results. CA, MD, and SA wrote the manuscript. All authors revised and approved the manuscript.

9. Conflict of Interest Statement

FKN is a co-inventor of a patent covering P2X7-antagonistic and P2X7-potentiating nanobodies.

Declaration of transparency and scientific rigour

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for Design & Analysis, and as recommended by funding agencies, publishers and other organisation engaged with supporting research.

10. REFERENCES

- Adriouch, S., Hubert, S., Pechberty, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., & Seman, M. (2007). NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *J Immunol*, *179*(1), 186-194. doi:10.4049/jimmunol.179.1.186
- Balazs, A. B., Bloom, J. D., Hong, C. M., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2013). Broad protection against influenza infection by vectored immunoprophylaxis in mice. *Nat Biotechnol*, *31*(7), 647-652. doi:10.1038/nbt.2618
- Berry, D., Kuzyk, O., Rauch, I., Heider, S., Schwab, C., Hainzl, E., ... Loy, A. (2015). Intestinal Microbiota Signatures Associated with Inflammation History in Mice Experiencing Recurring Colitis. *Front Microbiol*, *6*, 1408. doi:10.3389/fmicb.2015.01408
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, *112*(2), 358-404. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
- Brady, J. M., Baltimore, D., & Balazs, A. B. (2017). Antibody gene transfer with adeno-associated viral vectors as a method for HIV prevention. *Immunol Rev*, *275*(1), 324-333. doi:10.1111/imr.12478
- Cesaro, A., Brest, P., Hofman, V., Hebuterne, X., Wildman, S., Ferrua, B., ... Hofman, P. (2010). Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *299*(1), G32-42. doi:10.1152/ajpgi.00282.2009
- Chen, Z., Wang, S., Li, L., Huang, Z., & Ma, K. (2018). Anti-Inflammatory Effect of IL-37-Producing T-Cell Population in DSS-Induced Chronic Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Int J Mol Sci*, *19*(12)doi:10.3390/ijms19123884
- Colella, P., Ronzitti, G., & Mingozzi, F. (2018). Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*, *8*, 87-104. doi:10.1016/j.omtm.2017.11.007
- Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., ... Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol*, *175*(7), 987-993. doi:10.1111/bph.14153
- Danquah, W., Koch-Nolte, F., Stortelers, C., & Toon, L. (2013). P2X7 receptor antagonists and agonists. Ablynx N.V., *European Patent Office* (WO2013178783A1). URL:<https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DWO2013178783A1>
- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., ... Koch-Nolte, F. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med*, *8*(366), 366ra162. doi:10.1126/scitranslmed.aaf8463
- Demeules, M., Scarpitta, A., Abad, C., Gonde, H., Hardet, R., Pinto-Espinoza, C., ... Adriouch, S. (2020). Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front Oncol*, *10*, 1699. doi:10.3389/fonc.2020.01699
- Eichele, D. D., & Kharbanda, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*, *23*(33), 6016-6029. doi:10.3748/wjg.v23.i33.6016
- Ghetie, V., Popov, S., Borvak, J., Radu, C., Matesoi, D., Medesan, C., ... Ward, E. S. (1997). Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol*, *15*(7), 637-640. doi:10.1038/nbt0797-637
- Gu, B., Bendall, L. J., & Wiley, J. S. (1998). Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*, *92*(3), 946-951. doi:doi.org/10.1182/blood.V92.3.946
- Heiss, K., Janner, N., Mahnss, B., Schumacher, V., Koch-Nolte, F., Haag, F., & Mittrucker, H. W. (2008). High sensitivity of intestinal CD8⁺ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses. *J Immunol*, *181*(6), 3861-3869. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3861

- Hofman, P., Cherfils-Vicini, J., Bazin, M., Ilie, M., Juhel, T., Hebuterne, X., ... Vouret-Craviari, V. (2015). Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cancer Res*, 75(5), 835-845. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1778
- Homerin, G., Jawhara, S., Dezitter, X., Baudalet, D., Dufrenoy, P., Rigo, B., ... Ghinet, A. (2020). Pyroglutamide-Based P2X7 Receptor Antagonists Targeting Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem*, 63(5), 2074-2094. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00584
- Hong, S., Schwarz, N., Brass, A., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., ... Dubyak, G. R. (2009). Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular nicotinamide adenine dinucleotide and ecto-ADP-ribosyltransferases in murine macrophages and T cells. *J Immunol*, 183(1), 578-592. doi:10.4049/jimmunol.0900120
- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., ... Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med*, 207(12), 2561-2568. doi:10.1084/jem.20091154
- Illes, P., Muller, C. E., Jacobson, K. A., Grutter, T., Nicke, A., Fountain, S. J., ... Di Virgilio, F. (2021). Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br J Pharmacol*, 178(3), 489-514. doi:10.1111/bph.15299
- Jo, S., & Bean, B. P. (2011). Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by brilliant blue G. *Mol Pharmacol*, 80(2), 247-257. doi:10.1124/mol.110.070276
- Kepp, O., Loos, F., Liu, P., & Kroemer, G. (2017). Extracellular nucleosides and nucleotides as immunomodulators. *Immunol Rev*, 280(1), 83-92. doi:10.1111/imr.12571
- Koch-Nolte, F., Eichhoff, A., Pinto-Espinoza, C., Schwarz, N., Schafer, T., Menzel, S., ... Adriouch, S. (2019). Novel biologics targeting the P2X7 ion channel. *Curr Opin Pharmacol*, 47, 110-118. doi:10.1016/j.coph.2019.03.001
- Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P. H., Cirino, G., Docherty, J. R., ... Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. *Br J Pharmacol*, 177(16), 3611-3616. doi:10.1111/bph.15178
- Marques, C. C., Castelo-Branco, M. T., Pacheco, R. G., Buongusto, F., do Rosario, A., Jr., Schanaider, A., ... de Souza, H. S. (2014). Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis. *Biochim Biophys Acta*, 1842(1), 65-78. doi:10.1016/j.bbadis.2013.10.012
- Metzger, M. W., Walser, S. M., Aprile-Garcia, F., Dedic, N., Chen, A., Holsboer, F., ... Deussing, J. M. (2017). Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. *Purinergic Signal*, 13(2), 153-170. doi:10.1007/s11302-016-9546-z
- Mitra, S., & Sarkar, A. (2019). Microparticulate P2X7 and GSDM-D mediated regulation of functional IL-1 β release. *Purinergic Signal*, 15(1), 119-123. doi:10.1007/s11302-018-9640-5
- Moon, H., Na, H. Y., Chong, K. H., & Kim, T. J. (2006). P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett*, 102(1), 98-105. doi:10.1016/j.imlet.2005.08.004
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 82, 775-797. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Nemetz, N., Abad, C., Lawson, G., Nobuta, H., Chhith, S., Duong, L., ... Waschek, J. A. (2008). Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *Int J Cancer*, 122(8), 1803-1809. doi:10.1002/ijc.23308
- Neves, A. R., Castelo-Branco, M. T., Figliuolo, V. R., Bernardazzi, C., Buongusto, F., Yoshimoto, A., ... de Souza, H. S. (2014). Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 20(3), 444-457. doi:10.1097/01.MIB.0000441201.10454.06
- Pelegrin, P. (2021). P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime. *Biochem Pharmacol*, 187, 114385. doi:10.1016/j.bcp.2020.114385

- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., ... Wurbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, *18*(7), e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410
- Rissiek, B., Haag, F., Boyer, O., Koch-Nolte, F., & Adriouch, S. (2015). P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol*, *6*, 204. doi:10.3389/fimmu.2015.00204
- Saber, S., Youssef, M. E., Sharaf, H., Amin, N. A., El-Shedody, R., Aboutouk, F. H., ... Gobba, N. A. (2021). BBG enhances OLT1177-induced NLRP3 inflammasome inactivation by targeting P2X7R/NLRP3 and MyD88/NF-kappaB signaling in DSS-induced colitis in rats. *Life Sci*, *270*, 119123. doi:10.1016/j.lfs.2021.119123
- Scheuplein, F., Rissiek, B., Driver, J. P., Chen, Y. G., Koch-Nolte, F., & Serreze, D. V. (2010). A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes. *J Autoimmun*, *34*(2), 145-154. doi:10.1016/j.jaut.2009.08.012
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., ... Koch-Nolte, F. (2009). NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol*, *182*(5), 2898-2908. doi:10.4049/jimmunol.0801711
- Schwarz, N., Drouot, L., Nicke, A., Fliegert, R., Boyer, O., Guse, A. H., ... Koch-Nolte, F. (2012). Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS One*, *7*(7), e41269. doi:10.1371/journal.pone.0041269
- Schwarz, N., Fliegert, R., Adriouch, S., Seman, M., Guse, A. H., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2009). Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. *Purinergic Signal*, *5*(2), 139-149. doi:10.1007/s11302-009-9135-5
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., ... Koch-Nolte, F. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*, *19*(4), 571-582. doi:10.1016/s1074-7613(03)00266-8
- Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci Signal*, *2*(56), pe6. doi:10.1126/scisignal.256pe6
- Wan, P., Liu, X., Xiong, Y., Ren, Y., Chen, J., Lu, N., ... Bai, A. (2016). Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 x 7 receptor signaling. *Sci Rep*, *6*, 19108. doi:10.1038/srep19108
- Wetzel, A., Scholtka, B., Gerecke, C., & Kleuser, B. (2020). Epigenetic histone modulation contributes to improvements in inflammatory bowel disease via EBI3. *Cell Mol Life Sci*, *77*(23), 5017-5030. doi:10.1007/s00018-020-03451-9

11. Figure Legends

Figure 1. Comparison of different AAVnano vectors on their potential to modulate P2X7 function *in vivo* upon their i.m. administration

Mice (n=3) were injected with Nb-encoding AAV vectors in the gastrocnemius muscles at day 0. **A.** Scheme of the nanobody-based biologics used in our study and to the AAVnano vectors coding for these constructs. Two types of format have been evaluated, a nanobody-Fc fusion protein, termed nano-Fc, where the Fc region of a mouse IgG1 (carrying the “LSF” mutations T252L, T254S, T256F to confer increased half-life *in vivo*), or a nanobody dimer (dim) fused to a third anti-albumin (Alb8) nanobody, termed nano-dimHLE, that also confers half-life extension (HLE) *in vivo*. **B-C.** AAVnano vectors coding for the indicated nanobody-based biologics were injected i.m. at a dose of 10^{11} vg/mouse. Blood samples were collected 15 (**B**) or 17 (**C**) days post i.m. injections and the functional activity of P2X7 at the surface of T cell subsets was evaluated upon incubation with 150 μ M ATP. Flow cytometry profiles of CD62L expression and percentages of CD4⁺CD27⁺CD62L^{high} cells in the gated CD8⁺, CD4⁺CD25⁻, or CD4⁺CD25⁺ (Tregs) subsets are shown. One representative experiment out of at least two is shown with n=3 mice per experiment.

Figure 2. Evaluation of the potentiating effect of AAV-14D5-dimHLE vector on the activity of P2X7 following its i.m. administration

AAV-14D5-dimHLE vector was injected i.m. at a dose 10^{11} vg/mouse. Blood cells were collected 21 days later and the functional activity of P2X7 on the surface of T cell subsets was evaluated upon incubation with 30 μ M or 150 μ M ATP. Flow cytometry

profiles of CD62L expression (**A**) and percentages (**B**) of CD4⁺CD27⁺CD62L^{high} cells in the gated CD8⁺, CD4⁺CD25⁻, or CD4⁺CD25⁺ (Tregs) subsets are shown. One representative experiment out of at least two is shown with n=3 mice per experiment.

Figure 3. Evaluation of the blocking effect of AAV-13A7-Fc vector on the activity of P2X7 following i.m. administration of different doses of the AAVnano vector.

AAV-13A7-Fc vector was injected i.m. at the indicated AAVnano dose and blood cells were collected 15 days later to evaluate the functional activity of P2X7 on the surface of CD4⁺ T cells upon incubation with 150 μM ATP. The flow cytometry profiles illustrate the P2X7-dependant shedding of CD62L from the gated CD4⁺ T cells after incubation with 150 μM ATP for 15 min. The indicated numbers correspond to the percentages of CD62L^{high} cells in each experimental conditions after treatment with 150 μM ATP. The percentages obtained in the absence of ATP is 86% (not shown). One representative experiment out of at least two is shown with n=1 mouse per dose.

Figure 4. Evaluation of the AAV-13A7-Fc blocking and of the AAV-14D5-dimHLE potentiating vectors on the activity of P2X7 overtime and evaluation of the kinetic of nanobody-based biologics production *in vivo* upon a single i.m. injection of each AAVnano vector.

AAV-13A7-Fc or AAV-14D5-dimHLE vectors were injected i.m. at a dose of 10¹¹ vg/mouse and blood cells or sera were collected at the indicated time points **A**. Blood cells were incubated with 150 μM or 30 μM ATP, as indicated, and the percentages of CD4⁺CD62L^{high} cells were determined by flow cytometry as an evaluation of P2X7 activity on the surface of the gated CD4⁺ T cells. The first two bars

in each graph correspond, respectively, to negative and positive control cells collected from untransduced control mice treated or not with the indicated concentration of ATP. Results represent mean values \pm SEM, with n=2-3 mice per group. **B.** The concentration of unbound 13A7-Fc and 14D5-dimHLE nanobody-based biologics in the sera collected at each indicated time points were titrated by flow cytometry using a P2X7-expressing cell line and standard curves obtained with the same recombinant biologics produced *in vitro*. Results represent mean values \pm SEM, with n=3 mice per group.

Figure 5. AAV-13A7-Fc administration ameliorated acute DSS-induced colitis.

Mice (n=10) received 10^{11} vg of AAVnano coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and three weeks later they were given 2.5% DSS in drinking water for five days. Mice were switched to regular water for eight additional days and colons were collected at the end of the study. **A.** Disease activity score (DAI). **B.** Colon macroscopic appearance. **C.** Histopathological analysis of colon stained with hematoxylin and eosin staining. Mean \pm SEM are shown. Statistical comparison Two-way ANOVA (A) or one-way ANOVA (B and C) was performed with *p<0.05 and **p<0.01. One representative experiment out of three is shown.

Figure 6. AAV-13A7-Fc administration ameliorated chronic DSS-induced colitis.

Mice (n=10) received 10^{11} vg of AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and received three cycles of 2.5% DSS in drinking water for five days followed by regular water for eight additional days. Disease activity score (DAI) curves and cumulative and mean DAI scores are shown. Mean \pm SEM are shown. Statistical comparison two-way

ANOVA (top panels) or one-way ANOVA (bottom panels) were performed with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. A representative experiment out of three is shown.

Figure 7. Blocking effect of AAV-13A7-Fc administration on CD27 and CD62L shedding during DSS administration. A. Blood samples were collected three weeks after AAV-13A7-Fc or AAV-14D5-dimHLE i.m. injection (before DSS) or 13 days later (*i.e.*, after DSS 2.5 % for 5 days followed by 8 days of regular water). CD62L and CD27 shedding was evaluated by flow cytometry on the indicated gated T cell subsets after incubation, or not, with 150 μ M ATP. The top panels illustrate the flow cytometry gating strategy and the bottom panels the percentage of CD27⁺CD62L^{high} in each indicated T cell subset. **B.** Plasma were collected before DSS treatment start (three weeks after AAV injection) and after 2.5% DSS + regular water treatment (day 13). Concentrations of unbound nanobody-based biologics were titrated by flow cytometry using a P2X7-expressing cell line and standard curves obtained with the same recombinant biologics produced *in vitro*. One representative experiment out of three is shown, with n=5-6 mice per group in each experiment. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 8. Chemokines and proinflammatory cytokine productions were reduced in mice receiving AAV-13A7-Fc. Mice (n=10) receiving AAVnano coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE at a dose of 10^{11} vg/mouse, were given three weeks later 2.5% DSS in the drinking water for five days. Colons were collected on day 13 for chemokine and cytokine assessments. **A.** mRNA expression of multiple chemokines (CXCL9, CXCL10 and CCL2) and cytokines (IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18 and IL-22) in the colons of

mice injected with AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and exposed to DSS (day 13 from the beginning of DSS treatment). **B.** IL-1 β and IL-18 levels in the supernatants of colon explants after 16 h of culture. Results represent the combined data of two different experiments normalized to the DSS-treated group expression values. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure S1. Evaluation of the blocking effect of AAV-13A7-Fc vector on the activity of P2X7 at the surface of CD4⁺ T cells 12 weeks after i.m. administration of different doses of the AAVnano vector.

AAV-13A7-Fc vector was injected i.m. with the indicated AAVnano dose and blood cells were collected 12 weeks later to evaluate the functional activity of P2X7 at the surface of CD4⁺ T cells upon incubation with the indicated dose of ATP ranging from 150 μ M to 600 μ M ATP. The flow cytometry profiles illustrate the P2X7-dependant shedding of CD62L from the gated CD4⁺ T cells after incubation with the indicated dose of ATP in mice injected 12 weeks earlier with the indicated dose of AAV-13A7-Fc vector. The indicated numbers correspond to the percentages of CD62L^{high} cells in each experimental conditions after treatment with ATP. The graph bars recapitulate the data obtained in this experiment for each indicated dose of AAV-13A7-Fc vector.

Figure S2. Evaluation of the blocking effect of AAV-13A7-Fc vector on the activity of P2X7 at the surface of CD8⁺ T cells 12 weeks after i.m. administration of different doses of the AAVnano vector.

AAV-13A7-Fc vector was injected i.m. with the indicated AAVnano dose and blood cells were collected 12 weeks later to evaluate the functional activity of P2X7 at the

surface of CD8⁺ T cells upon incubation with the indicated concentration of ATP ranging from 150 μ M to 600 μ M. The flow cytometry profiles illustrate the P2X7-dependant shedding of CD62L from the gated CD8⁺ T cells after incubation with the indicated dose of ATP in mice injected 12 weeks earlier with the indicated dose of AAV-13A7-Fc vector. The indicated numbers correspond to the percentages of CD62L^{high} cells in each experimental conditions after treatment with ATP. The graph bars recapitulate the data obtained in this experiment for each indicated dose of AAV-13A7-Fc vector.

Figure S3. Comparison of the P2X7 activity at the surface of T cells collected from AAV-13A7-Fc injected mice or from P2X7^{-/-} mice.

AAV-13A7-Fc vector was injected i.m. at a dose of 10¹¹ vg/mouse and splenocytes were collected 120 days later to evaluate the functional activity of P2X7 at the surface of the indicated T cell subset and were compared to T cells collected from P2X7^{-/-} mice using the same experimental conditions. **A.** Histograms overlay showing expression of CD27 at the surface of CD4⁺ cells collected from untreated P2X7-deficient mice (green histograms) or from the WT mice that were treated as indicated (red histograms). Bar graphs showing the percentage of CD27⁺ cells (**B**), or CD27⁺CD62L^{high} (**C**) in the indicated gated T cell subset.

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

Mice (n=10) received 10¹¹ vg/mouse of AAV coding for 13A7-Fc or 14D5-dimHLE and three weeks later they were given 3% DSS in the drinking water. Mice were switched to regular water for eight additional days and colons were collected in the end of the study. **A.** Disease activity score (DAI) from 13A7-Fc and PBS-injected mice with a

higher dose of DSS (3%). **B.** Colon macroscopic appearance of naïve, untransduced and 13A7-Fc mice. **C.** Histopathological analysis of colon stained with hematoxylin and eosin staining. **D.** mRNA expression of chemokine CXCL10 and cytokines (TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-18 and IL-22) in the colons of mice injected with AAV coding for 13A7-Fc and exposed to DSS (day 13 from the beginning of DSS treatment). Mean \pm SEM are shown. For statistical comparison two-way ANOVA (A) or one-way ANOVA (B and C) were performed with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 1

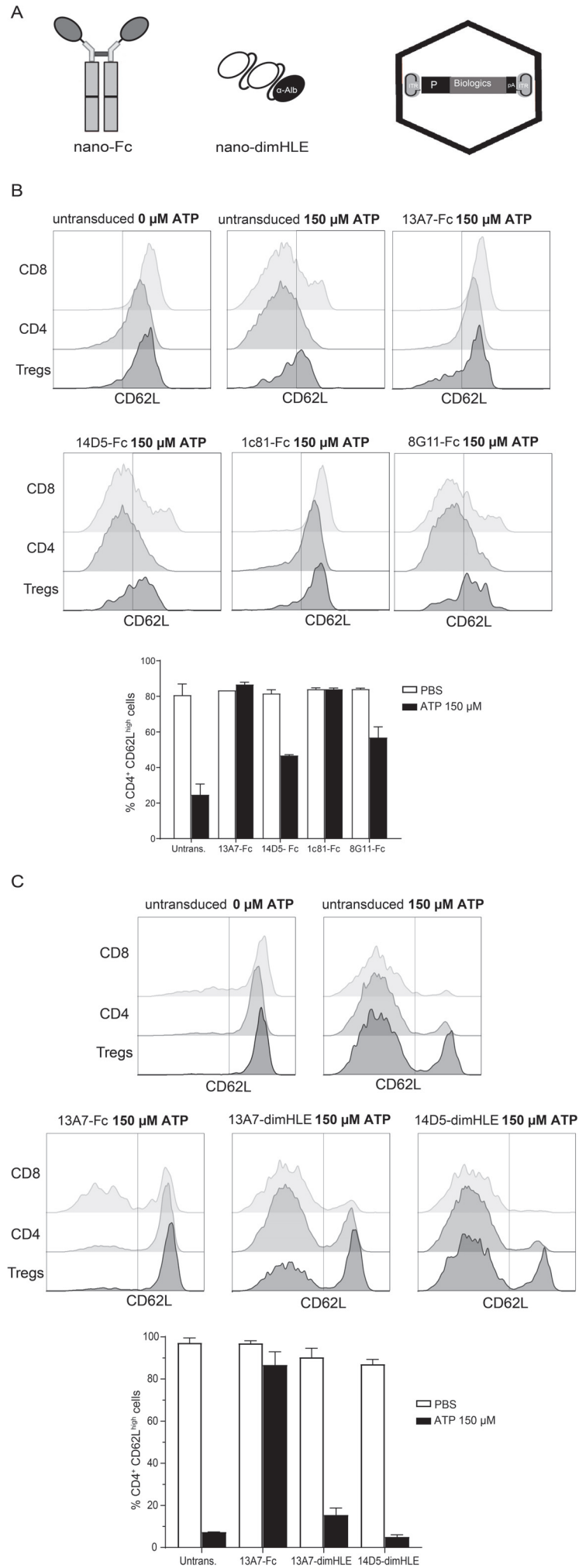


Figure 2

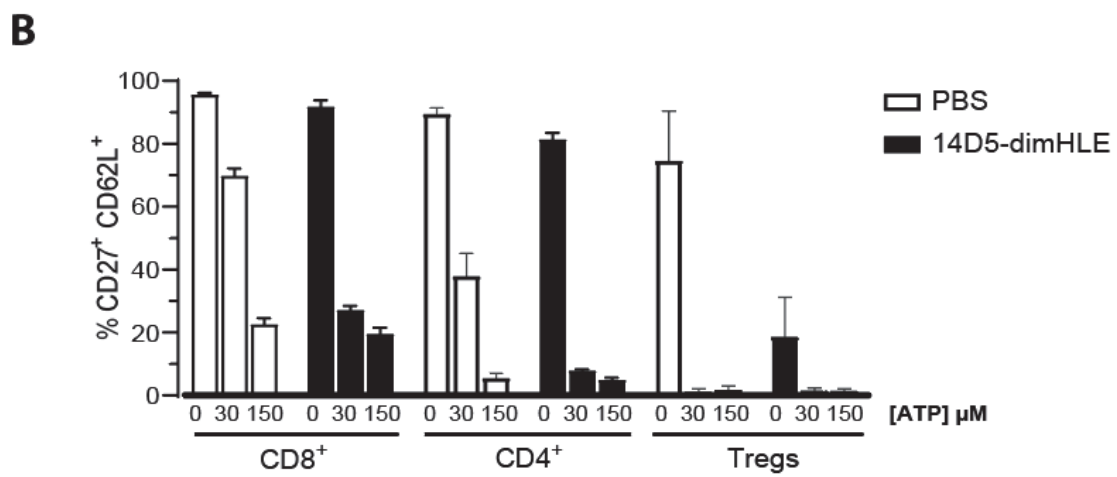
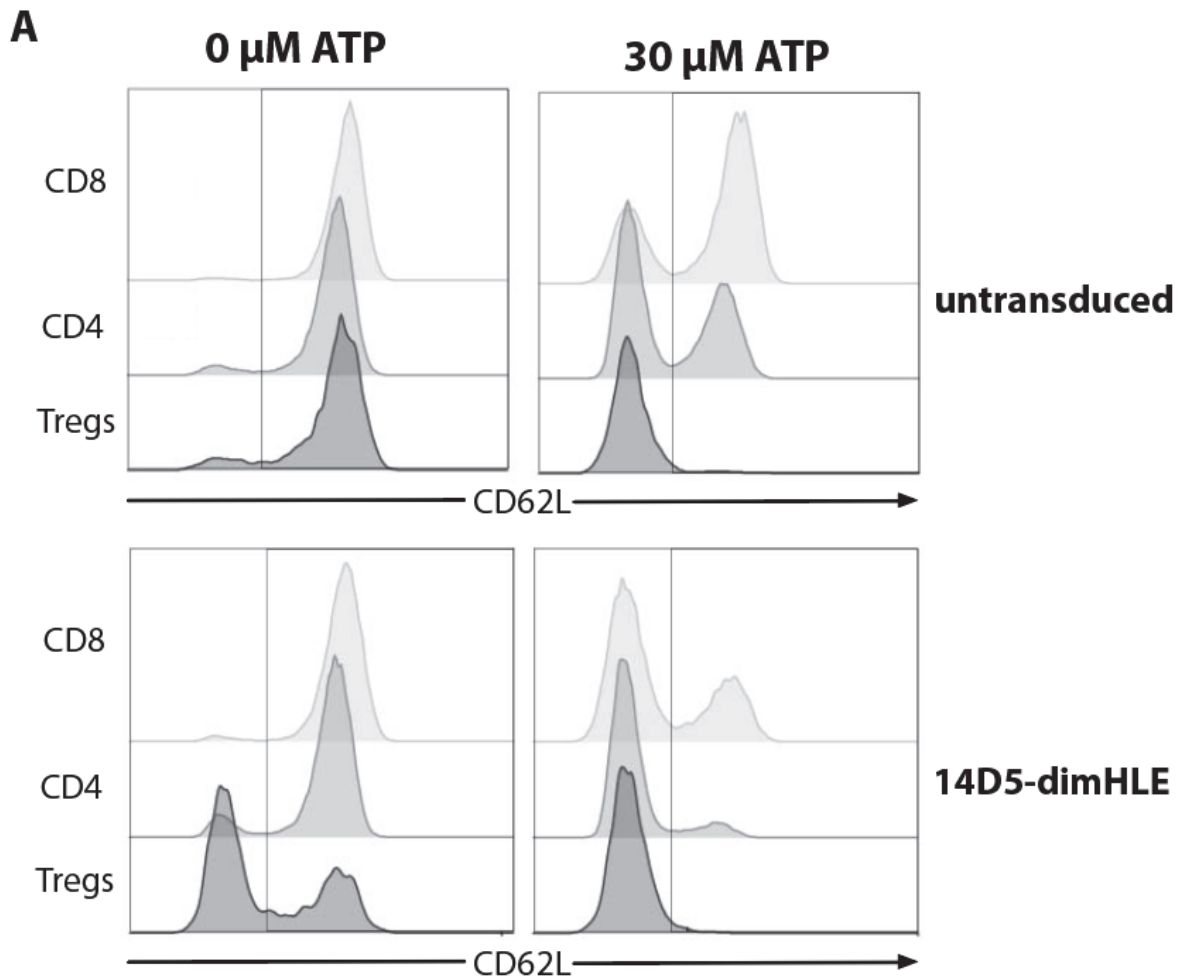


Figure 3

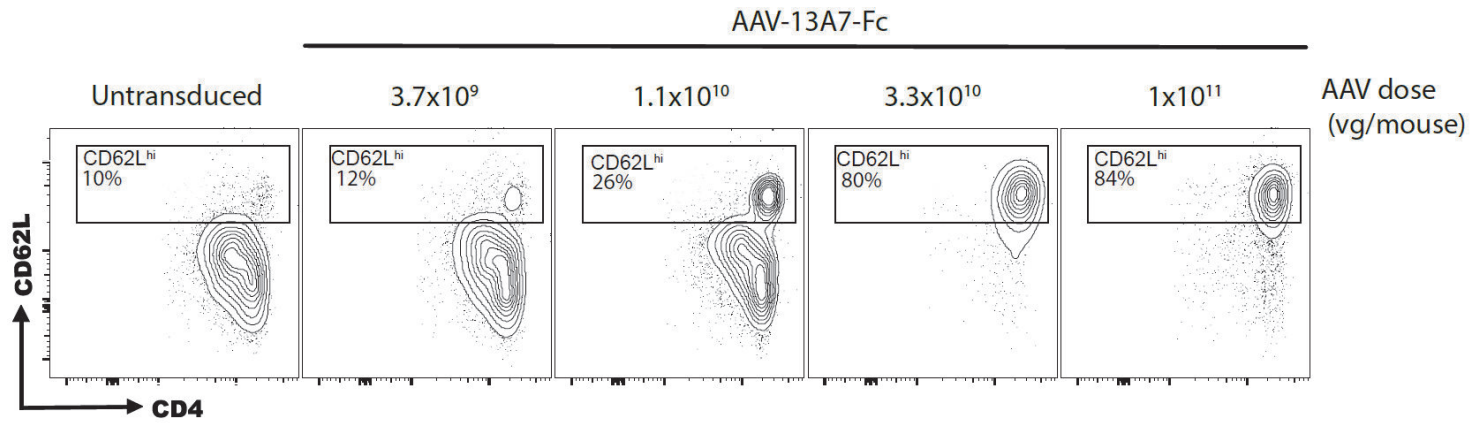


Figure 4

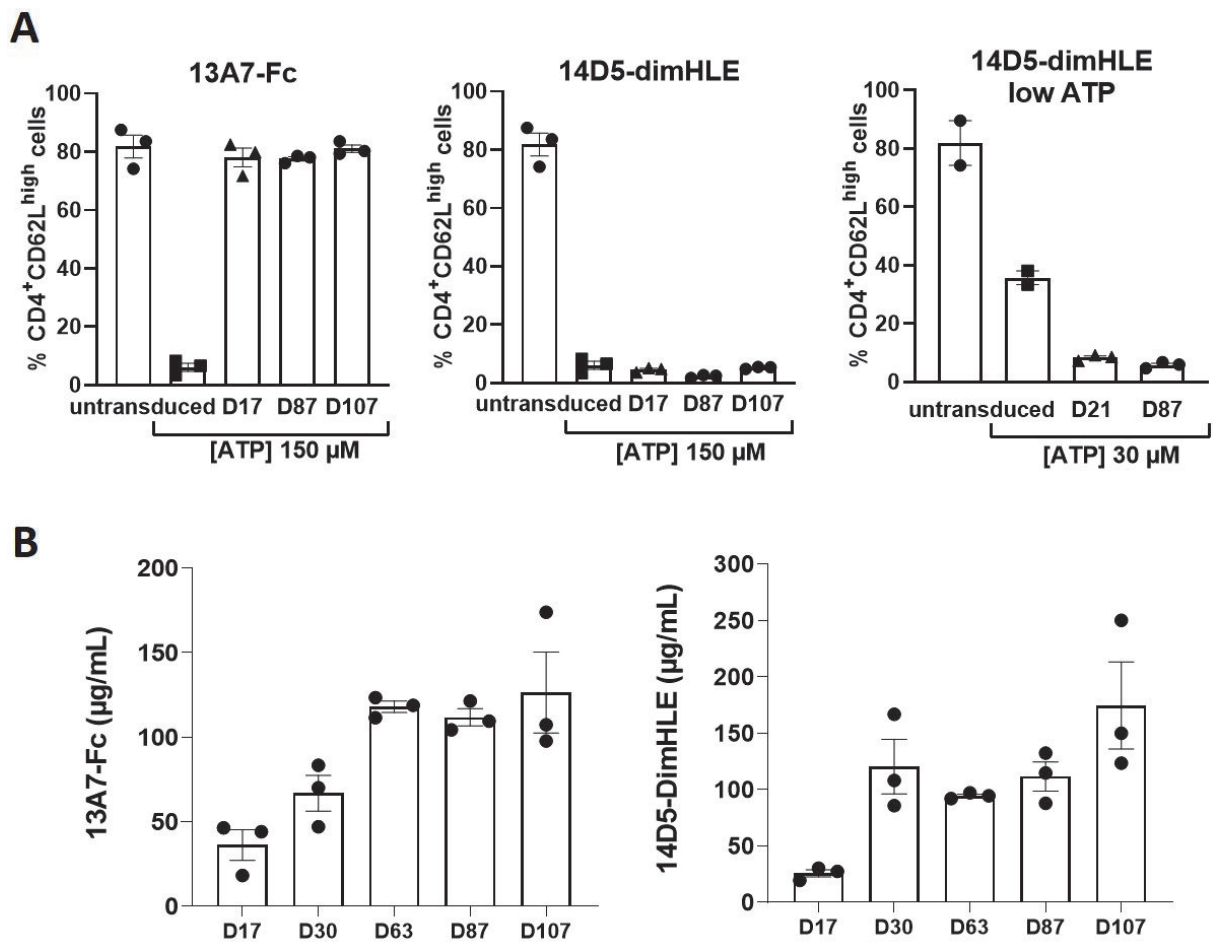


Figure 5

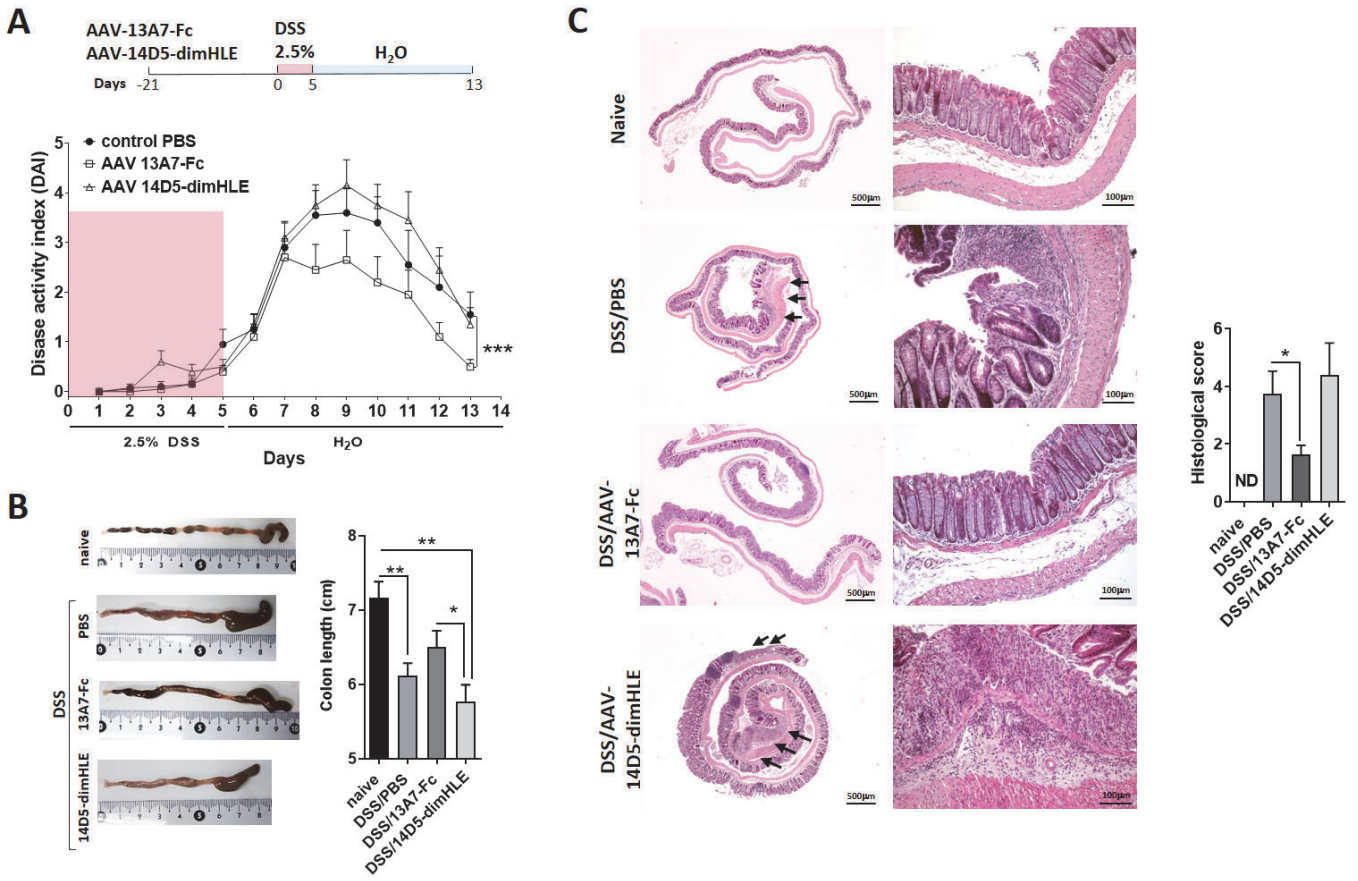


Figure 6

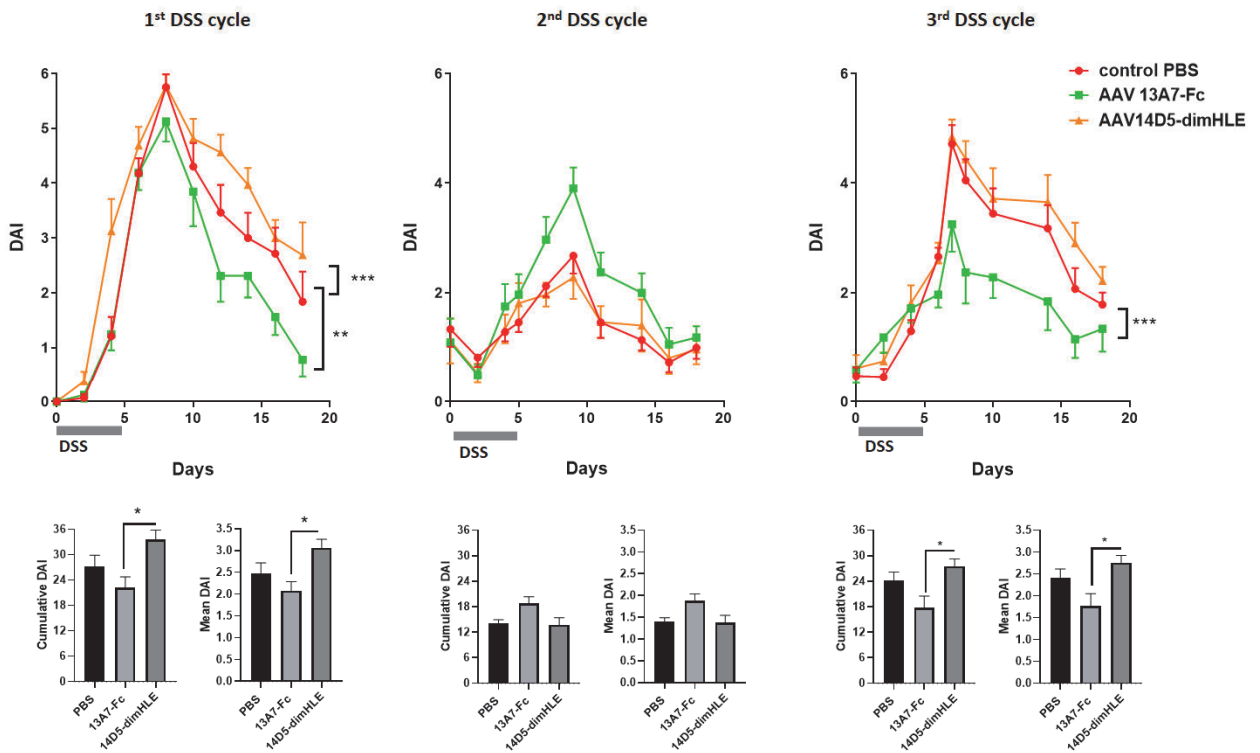


Figure 7

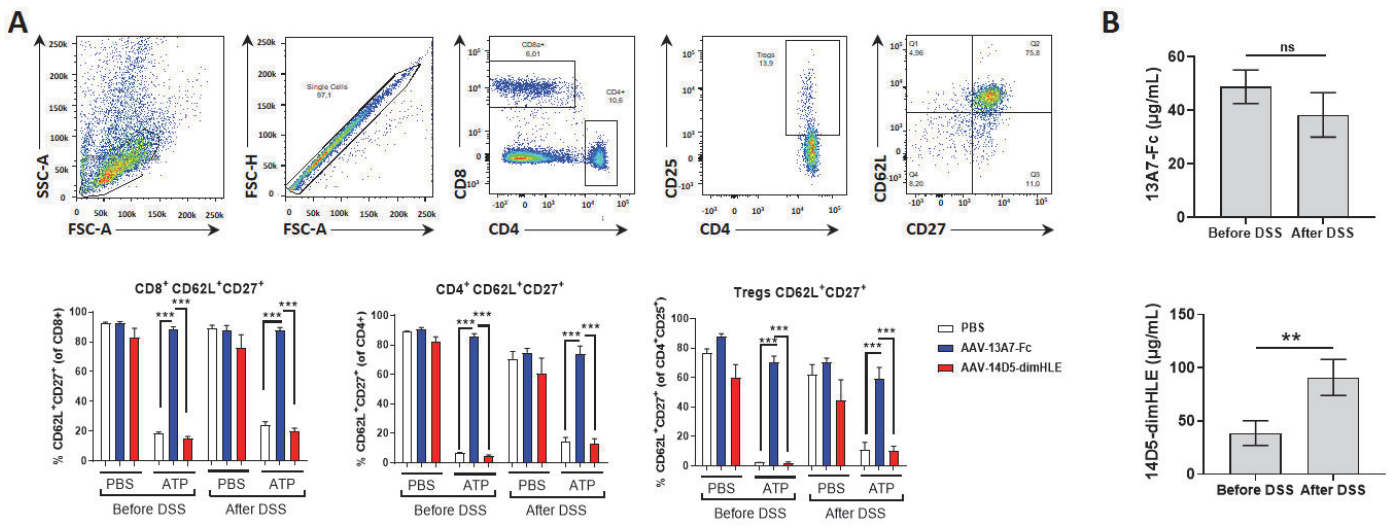


Figure 8

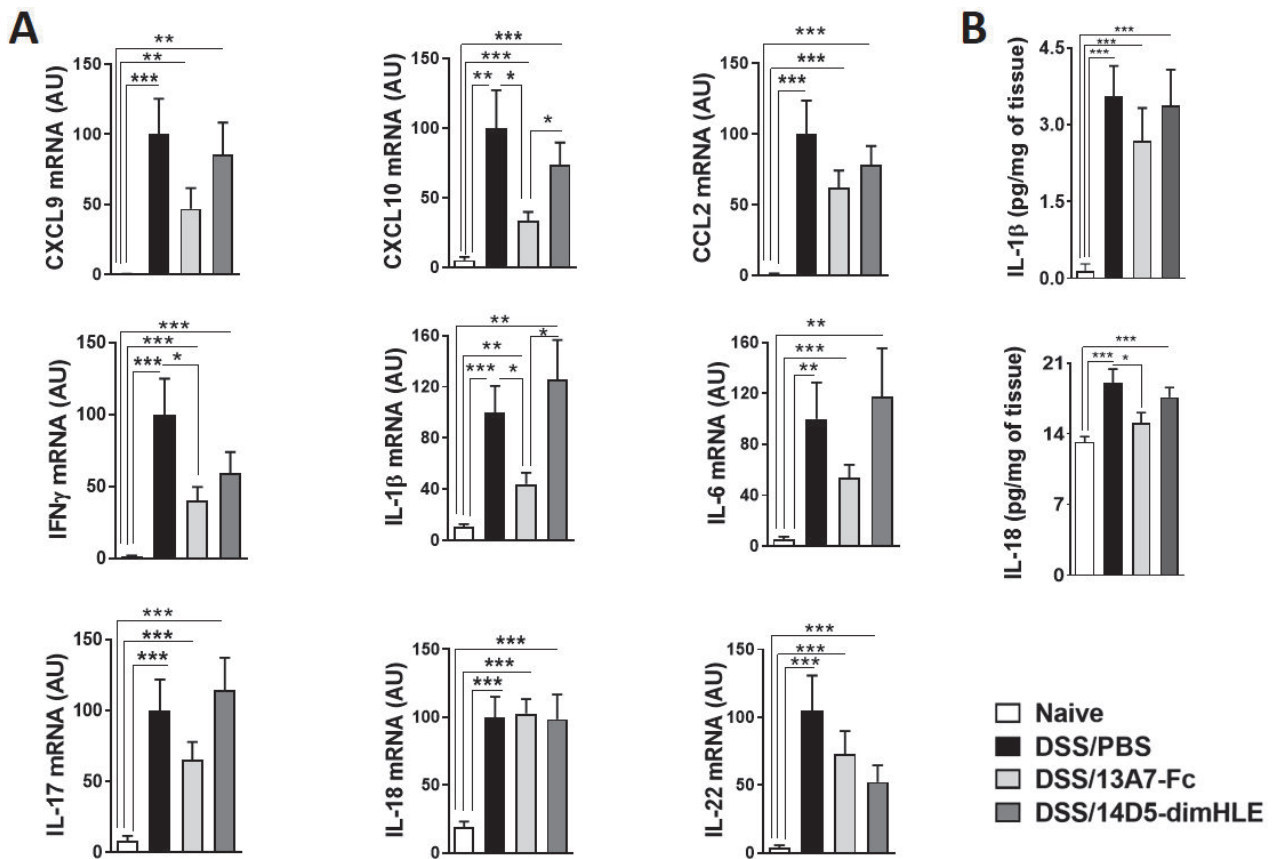


Figure S1 :

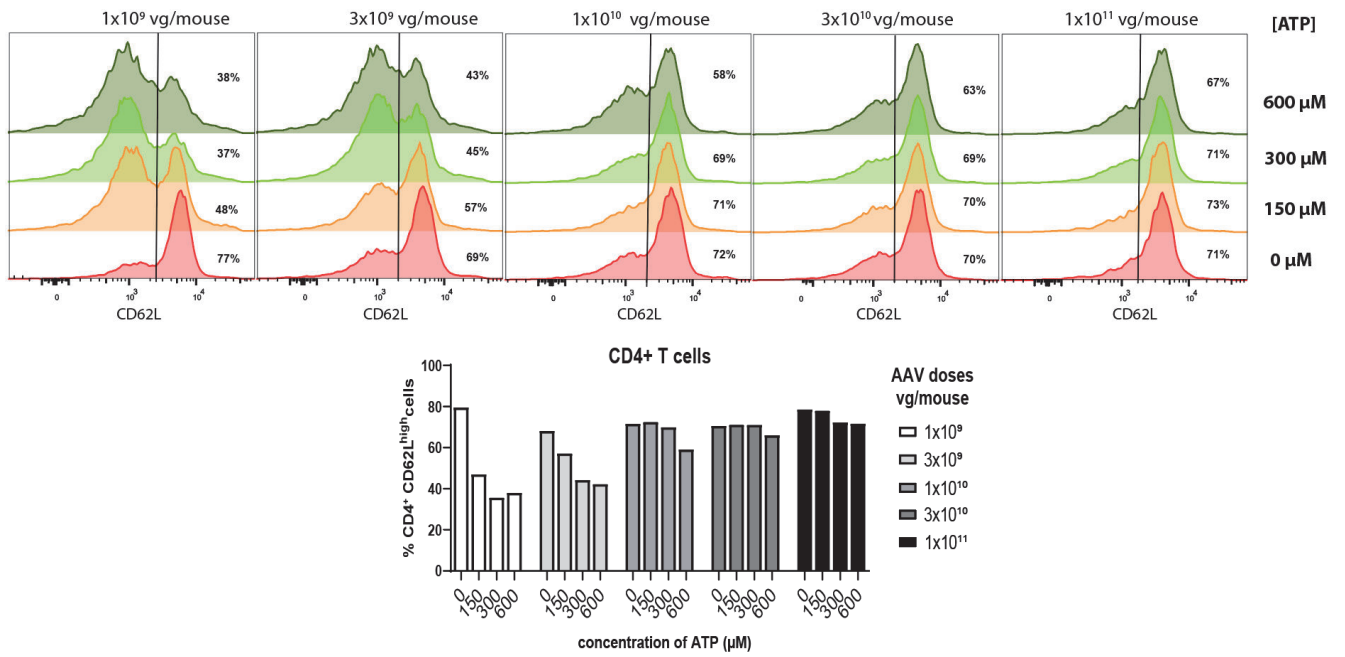


Figure S2 :

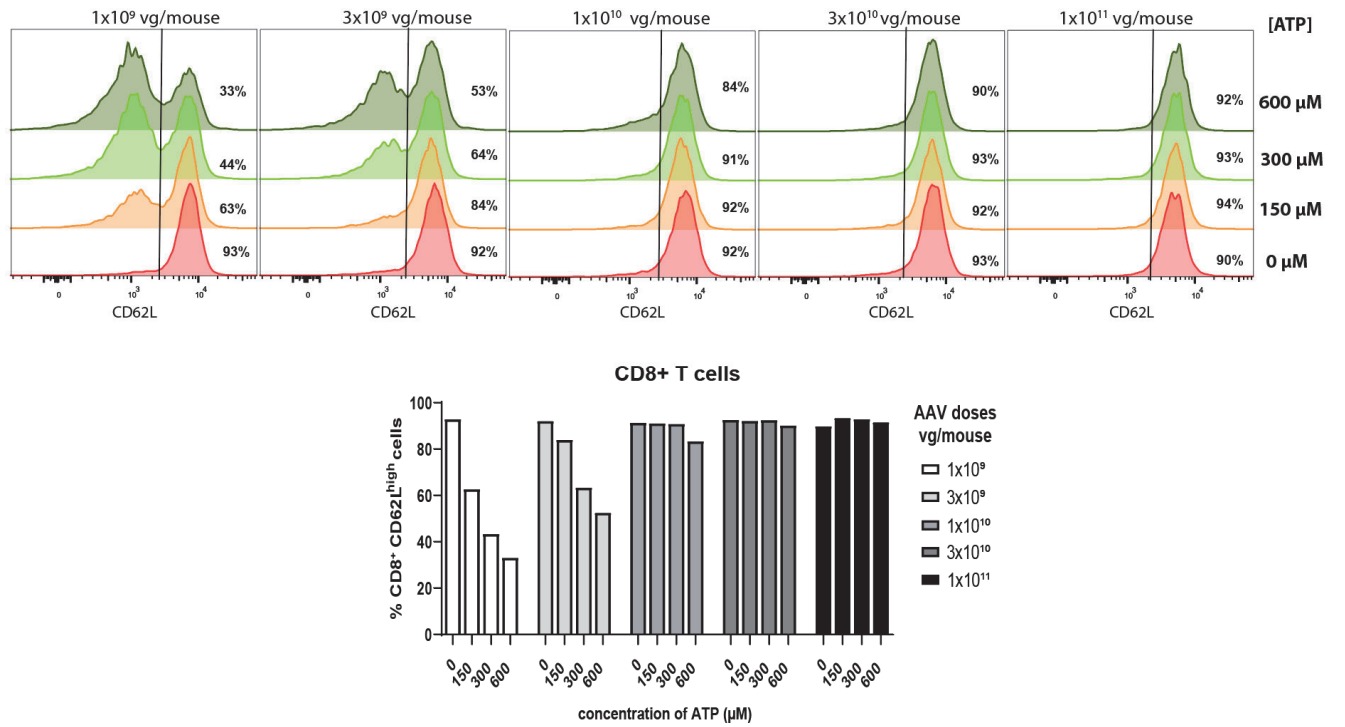


Figure S3 :

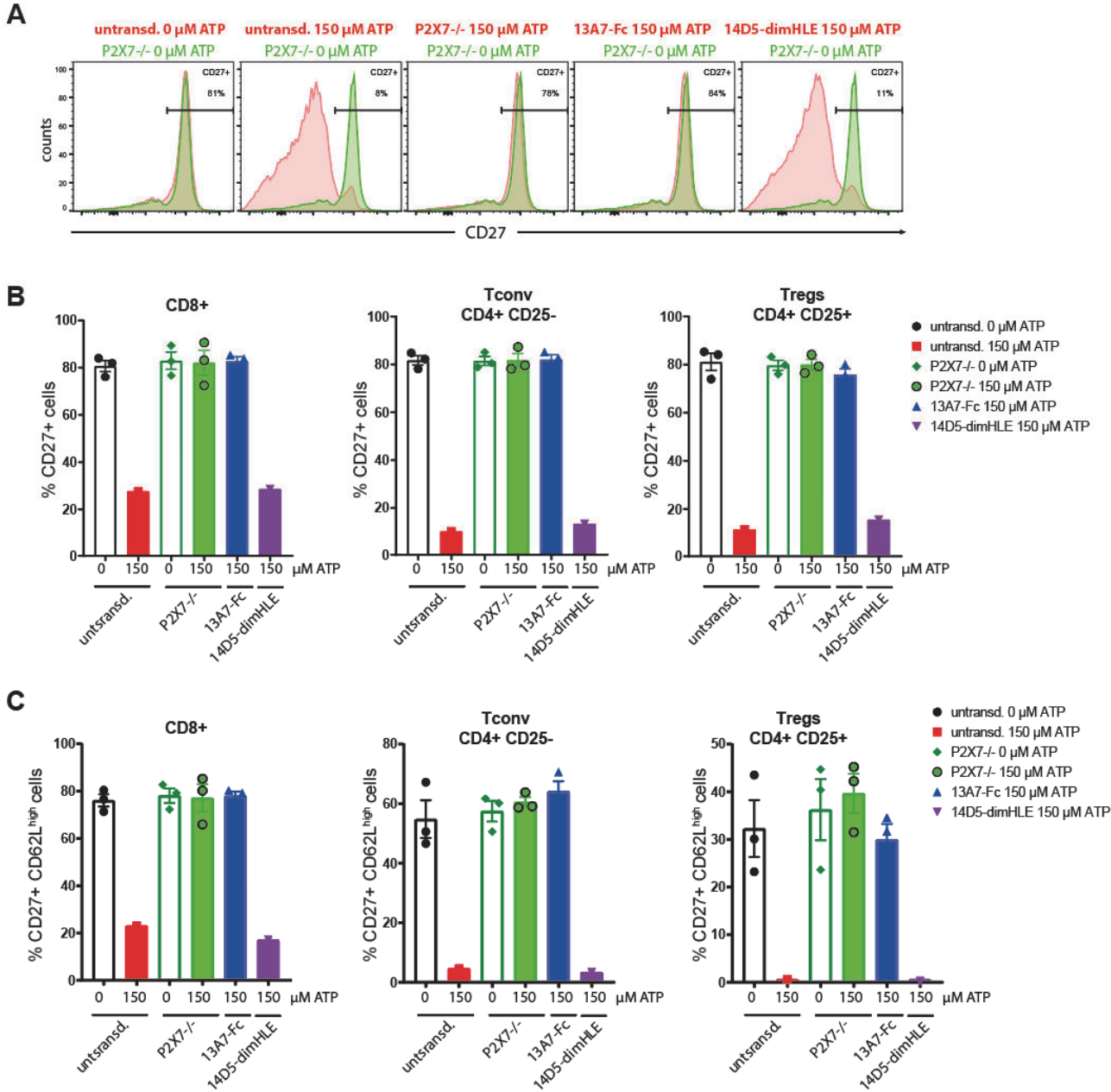
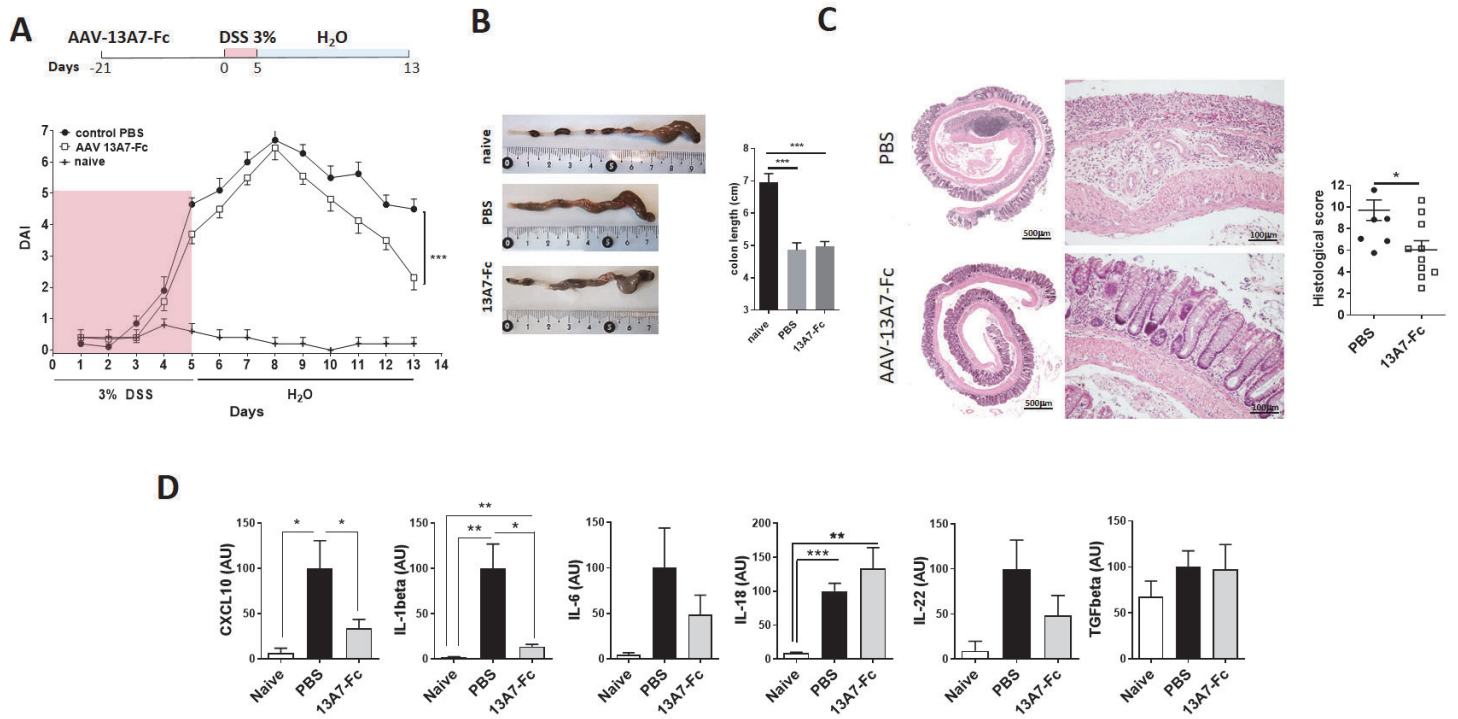


Figure S4 :



Article 2, publié dans *Frontiers in pharmacology*, 2022 DOI: 10.3389/fphar.2022.1029236.

Effective targeting of microglial P2RX7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs. Carolina Pinto-Espinoza, Charlotte Guillou, Björn Rissiek, Maximilian Wilmes, Ehsan Javidi, Nicole Schwarz, Marten Junge, Friedrich Haag, Nastassia Liaukouskaya, Nicola Wanner, Annette Nicke, Catelijne Stortelers, Yossan-Var Tan, Sahil Adriouch, Tim Magnus and Friedrich Koch-Nolte.

Contexte de l'étude. L'injection intraveineuse de nanocorps (Ncs) bloquant P2RX7 s'est avérée bénéfique dans des modèles murins d'inflammation systémique. P2RX7 est aussi apparu comme une cible thérapeutique intéressante pour les maladies inflammatoires du cerveau. Cependant, on sait peu de choses sur leur capacité à traverser la BHE. C'est pourquoi nous avons évalué l'habileté des Ncs spécifiques de P2RX7 à atteindre et à bloquer P2RX7 sur la microglie, après administration intraveineuse (i.v.) ou intracérébrale (i.c.). Notre objectif était donc d'évaluer l'adressage des Ncs bloquant P2RX7 avec des points isoélectriques (pi) différents et selon leur voie d'administration.

Méthodes. Pour cette étude, nous avons reformaté et optimisé les nanocorps P2RX7 pour une plus grande stabilité et un point isoélectrique élevé. Deux formats de Ncs bivalents (*i.e.* bispécifiques présentant deux domaines de liaison) ont été développés, soit avec la région Fc d'un Ac IgG1 classique (*i.e.* format Fc), soit avec la région HLE constituée d'un Ncs reconnaissant l'albumine Alb8 (*i.e.* format DimHLE). Les nanocorps 13A7-DimHLE (pi 5,9) ou 13A7-Fc (pi 5,8) bloquent spécifiquement l'activation du P2RX7 murin, tandis que le nanocorps 1c81s (pi 9,7) bloque à la fois le P2RX7 murin et humain, ce qui le rend intéressant pour des études translationnelles. Après l'injection de Ncs recombinant ou de vecteurs AAV codant pour des nanocorps (AAVnano), nous avons analysé les taux de fixation et de blocage de P2RX7 au niveau microgliale par cytométrie en flux.

Principaux résultats. Nous avons développé un test cellulaire sensible pour déterminer le niveau d'occupation de P2RX7 sur les cellules cérébrales (*i.e.* microglie) par rapport aux cellules des tissus périphériques (*i.e.* lymphocytes T résidents du rein, TRM). Elles ont été choisies pour leur expression élevée de P2RX7. Nous avons utilisé ce test pour évaluer la pharmacodynamique des nanocorps P2RX7 après des injections intraveineuses (i.v.), intracérébrales (intracérébroventriculaire (i.c.v) ou intraciterne magna (i.c.m.)) et intramusculaire (i.m.) d'AAV1 codant pour les Ncs. Dans un premier temps, nos résultats en injectant en i.c.v. des nanocorps recombinant montrent que les récepteurs P2RX7 sur la microglie étaient en quelques minutes complètement occupés et bloqués par ces nanocorps, même si injectés à faibles doses. En revanche, des doses très élevées étaient nécessaires pour obtenir des effets similaires lorsqu'elles étaient injectées par voie intraveineuse.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la capacité des Ncs produits par des vecteurs AAV1 à atteindre P2RX7 à la surface de la microglie. Dans une étude précédente, notre laboratoire avait montré que la délivrance de nanocorps par la technique AAVnano médiée par injection i.m. dans le muscle squelettique, entraînait une production endogène à long-terme de nanocorps par les cellules musculaires transduites par l'AAV (Gonde *et al.* 2021). Nous avons montré qu'une seule injection d'un AAV1 codant pour un nanocorps à chaîne lourde (13A7-Fc) en i.c.v. ou i.c.m. entraînait une production efficace de ces Ncs dans le cerveau, conduisant à un blocage fonctionnel complet de P2RX7 pour au moins 28 jours. De plus, une seule injection i.m. d'AAV1 codant pour 2 formats différents de nanocorps anti-P2RX7 (13A7-Fc ou 13A7-dim-HLE) permettait d'obtenir un blocage fonctionnel fort de P2RX7 sur la microglie qui persistait 120 jours après la transduction. Un blocage légèrement plus efficace est apporté par le nanocorps à chaîne lourde (13A7-Fc) par rapport Ncs dim-HLE, pouvant refléter des différences de production endogène ou une demi-vie sérique plus longue chez la souris.

Conclusion. Nos résultats fournissent de nouvelles informations sur les conditions d'adressage des nanocorps (*i.e.* voie, dose, temps d'administration) vers le SNC au niveau du P2RX7 microgliale. Le ciblage du P2RX7 par des nanocorps médié par les AAV semble être une stratégie prometteuse pour moduler ses actions dans le cadre d'inflammation cérébrale.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Kenneth A. Jacobson,
National Institutes of Health (NIH),
United States

REVIEWED BY
Yong Tang,
Chengdu University of Traditional
Chinese Medicine, China
Heike Wulff,
University of California, Davis,
United States

*CORRESPONDENCE
Friedrich Koch-Nolte,
nolte@uke.de

†PRESENT ADDRESS
Catelijne Stortelers,
VIB Discovery Sciences, Ghent, Belgium

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Experimental Pharmacology and Drug
Discovery,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 27 August 2022
ACCEPTED 23 September 2022
PUBLISHED 10 October 2022

CITATION

Pinto-Espinoza C, Guillou C, Rissiek B,
Wilmes M, Javidi E, Schwarz N, Junge M,
Haag F, Liaukouskaya N, Wanner N,
Nicke A, Stortelers C, Tan Y-V,
Adriouch S, Magnus T and Koch-Nolte F
(2022), Effective targeting of microglial
P2X7 following intracerebroventricular
delivery of nanobodies and nanobody-
encoding AAVs.
Front. Pharmacol. 13:1029236.
doi: 10.3389/fphar.2022.1029236

COPYRIGHT

© 2022 Pinto-Espinoza, Guillou, Rissiek,
Wilmes, Javidi, Schwarz, Junge, Haag,
Liaukouskaya, Wanner, Nicke,
Stortelers, Tan, Adriouch, Magnus and
Koch-Nolte. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). 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.

Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs

Carolina Pinto-Espinoza^{1,2}, Charlotte Guillou³, Björn Rissiek², Maximilian Wilmes², Ehsan Javidi², Nicole Schwarz^{1,4}, Marten Junge¹, Friedrich Haag¹, Nastassia Liaukouskaya⁵, Nicola Wanner⁵, Annette Nicke⁶, Catelijne Stortelers^{7†}, Yossan-Var Tan³, Sahil Adriouch³, Tim Magnus² and Friedrich Koch-Nolte^{1*}

¹Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ²Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ³Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1234, Pathophysiology, Autoimmunity and Immunotherapy (PanTHER), Rouen, France, ⁴MSH- Medical School Hamburg- Dep. Anatomy, Hamburg, Germany, ⁵Department of Nephrology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁶Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, LMU Munich, Munich, Germany, ⁷Ablynx-Sanofi, Ghent, Belgium

The P2X7 ion channel is a key sensor for extracellular ATP and a key trigger of sterile inflammation. Intravenous injection of nanobodies that block P2X7 has shown to be beneficial in mouse models of systemic inflammation. P2X7 has also emerged as an attractive therapeutic target for inflammatory brain diseases. However, little is known about the ability of nanobodies to cross the BBB. Here we evaluated the ability of P2X7-specific nanobodies to reach and to block P2X7 on microglia following intravenous or intracerebral administration. For this study, we reformatted and sequence-optimized P2X7 nanobodies for higher stability and elevated isoelectric point. Following injection of nanobodies or nanobody-encoding adeno-associated viral vectors (AAV), we monitored the occupancy and blockade of microglial P2X7 *in vivo* using *ex vivo* flow cytometry. Our results show that P2X7 on microglia was within minutes completely occupied and blocked by intracerebroventricularly injected nanobodies, even at low doses. In contrast, very high doses were required to achieve similar effects when injected intravenously. The endogenous production of P2X7-antagonistic nanobodies following intracerebral or intramuscular injection of nanobody-encoding AAVs resulted in a long-term occupancy and blockade of P2X7 on microglia. Our results provide new insights into the conditions for the delivery of nanobodies to

Abbreviations: AAV, adeno-associated viral vector; i.v., intravenous; i.c.v., intracerebroventricular; i.c.m., intracisterna magna; i.m., intramuscular; Nb, nanobody; VHH, variable heavy-chain antibody fragment.

microglial P2X7 and point to AAV-mediated delivery of P2X7 nanobodies as a promising strategy for the treatment of sterile brain inflammation.

KEYWORDS

P2X7 nanobodies, receptor occupancy, functional blockade, intracerebroventricular delivery, AAV-mediated delivery

1 Introduction

P2X7 is a ligand-gated non-selective cation channel that structurally assembles as a homomeric trimer (Nicke, 2008). P2X7 is expressed on the cell surface of various leukocytes, particularly at high levels on macrophages, microglia (Ferrari et al., 1996; He et al., 2017; Metzger et al., 2017) and resident T cells of the kidney (Stark et al., 2018; Borges da Silva et al., 2020). The physiological ligand of P2X7 is extracellular ATP. During inflammation, stressed and injured cells release large amounts of ATP that act as a danger associated molecular pattern (DAMP) (Choi et al., 2007; Falzoni et al., 2013). In LPS-primed microglia and monocytes, gating of P2X7 by ATP leads to the influx of Na⁺ and Ca²⁺ and the efflux of K⁺ (Choi and Kim, 1996; Egan and Khakh, 2004). Intracellular K⁺ depletion triggers the assembly of the NLRP3 inflammasome, a multiprotein complex that drives caspase-1-mediated maturation and release of leaderless IL-1 β , a key cytokine of the inflammatory response (Perregaux and Gabel, 1994; Ferrari et al., 1997; Sanz and Di Virgilio, 2000). Caspase-1 also cleaves Gasdermin D to generate free N-terminal domains which oligomerize at the plasma membrane to form pores through which mature IL-1 β is released (Shi et al., 2015; Ding et al., 2016; Evavold et al., 2018; Heilig et al., 2018). *In vitro*, ATP-induced pore formation has also been used to monitor P2X7 activation based on the increased membrane permeability to fluorescent molecules as for instance DNA-staining dyes such as DAPI (Yan et al., 2008).

In the CNS, inflammation and ischemia result in the local release of ATP at the site of tissue injury (Melani et al., 2005; Sanz et al., 2009; Grygorowicz et al., 2016). In addition, P2X7 activation on microglia has been implicated in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Matute et al., 2007; Grygorowicz and Struzynska, 2019), Alzheimer disease (AD) (McLarnon et al., 2006), and stroke (Franke et al., 2004; Melani et al., 2006; Skaper et al., 2006), which are often associated with an increased release of IL-1 β (Boutin et al., 2001; Rampe et al., 2004; Jin et al., 2008; Sanz et al., 2009; Maysami et al., 2016; Grygorowicz and Struzynska, 2019).

Pharmacological antagonists of P2X7 have been proposed as potential therapeutic tools to control inflammation in the brain. Because most of them have shown lack of specificity, low potency, diverse pharmacodynamics, and conversion into ineffective or toxic metabolites (Bartlett et al., 2014; Bhattacharya and Biber, 2016; Andrejew et al., 2020), only the BBB-penetrant JNJ-54175446 has entered into phase II clinical trials for inflammation (Recourt et al., 2020). Antibodies are highly desirable therapeutic molecules as they offer high specificity, safety, uniform pharmacodynamics, and low

toxicity. Nanobodies are antibody fragments consisting of a single variable domain (VHH) of a heavy chain antibody. Nanobodies are highly soluble and with a small size (~12 kDa), they bind to their target with high specificity, similar to conventional antibodies (Hamers-Casterman et al., 1993; Nguyen et al., 2000; Conrath et al., 2005; Wesolowski et al., 2009). We have previously generated highly specific P2X7-antagonistic nanobodies that dampened inflammation in mouse models of allergic contact dermatitis and experimental glomerulonephritis (Danquah et al., 2016). However, similar to other biologics, the therapeutic application of P2X7-antagonistic nanobodies in CNS inflammation encounters the BBB as physical obstacle which restricts the passage of molecules with a MW > 500 Da (Fischer et al., 1998; Pardridge, 2005).

Our goal was to evaluate the CNS delivery of two potent P2X7-blocking nanobodies, that differ in their isoelectric point (pI), using different routes of administration. Nanobody 13A7 (pI 5.9) specifically blocks ATP-induced activation of mouse P2X7 while nanobody 1c81^s (pI 9.7) blocks both mouse and human P2X7, making it of interest for translational studies. We developed a sensitive cell-based assay to determine the level of P2X7 occupancy on brain cells (microglia) in contrast to cells in peripheral tissue (resident T cells of the kidney, T_{RMS}). We chose these cell types because of their known high levels of P2X7 on the cell surface (Metzger et al., 2017; Stark et al., 2018). We used this assay to evaluate the pharmacodynamics of P2X7 nanobodies after intravenous or intracerebral injections, as well as after intramuscular delivery of nanobody-encoding AAV1. The results demonstrate that an effective targeting of P2X7 on microglia *in vivo* can be readily achieved by intracerebroventricular injection of P2X7 antagonistic nanobodies, even at low doses, but very high doses are required when injected intravenously. Furthermore, the endogenous production of P2X7-antagonistic nanobodies 120 days after transduction of muscle cells with nanobody-encoding AAVs resulted in a high, albeit not complete, occupancy and blockade of P2X7 on microglia, whereas transduction of brain cells with nanobody-encoding AAVs resulted, 28 days later, in a complete blockade of P2X7 on microglia.

2 Materials and methods

2.1 Antibodies and reagents

The following fluorochrome conjugated monoclonal antibodies (mAbs) were used for flow cytometry: anti-CD45

(30-F11), anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD11b (M1/70), anti-mouse IgG1 (RMG1-1), and purified anti-CD16/CD32, all purchased from Biolegend. Purified anti-VHH mouse IgG1 antibodies mAbH0077 and mAbH0074 were received from Ablynx and mAbs specific for mouse P2X1, P2X4, P2X7 were produced in house (Moller et al., 2007). Dead-cell staining was performed using DAPI and/or the AlexaFluor700 LIVE/DEAD Fixable Read Dead Stain Kit (Biolegend). For immunofluorescence microscopy the following fluorochrome conjugated reagents were used: isolectin purchased from ThermoFisher, anti-GFP B-2 mAb (sc-9996) from Santa Cruz, anti-ALFA tag nanobody (1G5) from Nano-tag technologies and purified anti-ALFA tag nanobody fused to a rabbit IgG produced in house. DNA staining was performed with Hoechst 33342 (ThermoFisher). ATP disodium salt was purchased from Sigma.

2.2 Construction and production of dimeric half-life extended nanobodies

P2X7-specific nanobodies 13A7, 14D5 and a sequence optimized variant of 1c81 with higher stability and elevated isoelectric point were engineered into bivalent half-life extended nanobodies, or bivalent Fc-fused format, as previously described (Danquah et al., 2016). Nanobody-constructs were subcloned into the pCSE2.5 expression vector either carrying at the C-terminus a tandem SNB tag (Schaffer et al., 2010) or carrying at the N-terminus an ALFA-tag (Gotzke et al., 2019). All nanobody constructs were produced as secretory proteins in transiently transfected HEK-6E cells cultivated in serum-free medium (cells provided by Ives Durocher, Montreal, Canada). After 6 days, cell-supernatants were harvested and clarified by centrifugation. Nanobodies were purified from the supernatants by affinity chromatography using protein A columns (GE Healthcare) and formulated at high concentrations (15–50 mg/ml) in an in-house low aggregation buffer (5.8 mg/ml sodium phosphate monobasic, monohydrate; 1.2 mg/ml sodium phosphate dibasic, anhydrous; 60 mg/ml trehalose; 0.4 mg/ml Tween®; pH 6.5). Integrity and purity were confirmed by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining.

2.3 Cell-based P2X7 binding assay

HEK 293 cells were transiently transfected with expression plasmids encoding the indicated proteins (eGFP, P2X1, P2X4, P2X7) using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. Cells were then sequentially incubated with the indicated nanobodies, mAbH0077 and BV421-conjugated anti-mouse IgG1 antibody. For the expression controls, cells were stained with the indicated

AF647-conjugated specific mAbs (anti-mouse P2X1, P2X4, P2X7, in house). Cells were analyzed by flow cytometry (BD-FACS-Celesta).

2.4 Real-time and endpoint calcium influx and DAPI uptake assays

For the real time experiments, primary mixed glial co-cultures were loaded with 2 μ M Fluo-4 (Invitrogen) for 15 min at 37°C, washed and resuspended in PBS supplemented with Ca²⁺ and Mg²⁺. Cells were incubated with 1 μ g of the indicated nanobodies for 20 min and after addition of DAPI, cells were analyzed by flow cytometry (BD-FACS-Canto). An infrared lamp was used to maintain a constant temperature during sample measurement. After equilibration, 0.5 mM ATP (Sigma) was added at the indicated time point (Veltkamp et al., 2022). Alternatively, Fluo-4 loaded HEK cells stably expressing mouse P2X7 were incubated with the indicated serially diluted nanobodies and stimulated with 1.5 mM ATP for 15 min. Intracellular Ca²⁺ was measured by fluorimetry on a plate reader heated at 37°C (Victor3, Perkin Elmer). For endpoint DAPI uptake assay, brain cells from nanobody-injected mice were stimulated with 0.5 mM ATP in RPMI containing DAPI, in presence or absence of 0.5 μ g of the same nanobody. Cells were washed in ice cold FACS buffer and CD11b⁺ CD45⁺ microglia were analyzed by flow cytometry.

2.5 IL-1 β release assays

Mixed glial primary co-cultures were incubated at 37°C sequentially with LPS (1 μ g/ml) for 4 h and with serial dilutions of the respective nanobodies for an additional 30 min. ATP (0.5 mM) was then added to the cells and, after 30 min of stimulation, the cells were centrifuged. IL-1 β levels were determined in the supernatants by ELISA (Biolegend).

2.6 Animals

Wild-type, P2X7^{-/-} (Labasi et al., 2002) and BAC transgenic P2X7-eGFP (line 17) (Kaczmarek-Hajek et al., 2018) mice in C57BL/6 background (8–12 weeks old) were bred in the animal facility of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Animals had free access to water and standard animal chow. All animal experiments and experiments involving tissue derived from animals were performed with approval of the responsible regulatory committee (Hamburger Behörde für Justiz und Verbraucherschutz, G12/130, N006/2018, 021/18, and French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation, APAFIS #27816). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

2.7 Systemic injections of nanobodies and fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb

Purified nanobodies were adjusted to the indicated concentrations in a sodium-phosphate buffer containing trehalose (60 mg/ml) and Tween® (0.4 mg/ml) and injected at the indicated doses either i.v. (100 µl) into the tail vein or i.c.v. (2 µl). PerCP-conjugated anti-CD45 mAb was adjusted to a concentration of 10 µg/ml, and 100 µl (1 µg) were injected into the tail vein 2–3 min before sacrifice. Mice were deeply anesthetized by isoflurane inhalation and then perfused transcardially with PBS-heparin (10 U/ml) for 4 min using a peristaltic pump at a rate of 8 ml/min. Shortly before perfusion, blood was drawn by terminal cardiac puncture. Nanobody encoding-AAV1 viral vectors were produced by Virovek, Hayward, United States (Gonde et al., 2021). For muscle transduction, mice were anesthetized and 10¹¹ viral genomes in 50 µl of PBS were injected per mouse in the gastrocnemius muscle located in the hindlimb. For CNS cell transduction, as above, 10¹¹ viral genomes of nanobody-encoding AAV1 viral vectors were administered either i.c.v. (4 µl) or intracisterna magna (i.c.m.) (20 µl) per mouse.

2.8 Preparation of microglia-astrocyte co-cultures

Neonatal C57BL6 mice were sacrificed by decapitation. Brains were dissected and the olfactory bulb, cerebellum and meninges were removed under the microscope. A cell suspension was prepared by mincing brain tissue in Hank's balanced salt solution. Cell pellets were collected and treated with 0.5 mg/ml papain (Sigma) and 0.01 mg/ml deoxyribonuclease type I (Sigma) in Hank's balanced salt solution, for 30 min at 37°C. Cells were then resuspended with BME medium supplemented with 10% FCS and filtered through a 70 µm cell strainer (EASY strainer, GBO). Cell pellets were collected, resuspended in 10% FCS BME medium and cultured in T-75 flasks (Sigma) for 21 days at 37°C with 5% CO₂.

2.9 Preparation of primary brain microglia, kidney leukocytes and splenocytes

After removal of the olfactory bulb and cerebellum, brains were cut into small 1–5 mm pieces in DMEM containing 1 mg/ml collagenase A (Roche) and 0.01 mg/ml deoxyribonuclease type I (Sigma) and incubated for 30 min at 37°C. Tissue fragments were dissociated using a 40 µm cell strainer (EASY strainer, GBO). Kidneys were cut with into small 1–5 mm fragments in DMEM containing 10% fetal calf serum, 0.4 mg/ml collagenase D (Roche) and 0.02 mg/ml deoxyribonuclease

type I (Sigma) and dissociated at 37°C for 30 min using a GentleMACS apparatus (Miltenyi Biotec). Cell pellets were gently resuspended and layered onto a 30% (brain cells) or 40% (kidney cells) Percoll gradient (GE healthcare) and bands corresponding to leucocytes were collected. Splens were minced in DMEM, 10% FCS using a 70 µm cell strainer (EASY strainer, GBO). Cells were washed and red-blood-cells were lysed using ACK erythrocyte lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.2). After washing, cells were resuspended in FACS Buffer.

2.10 Immunofluorescence microscopy

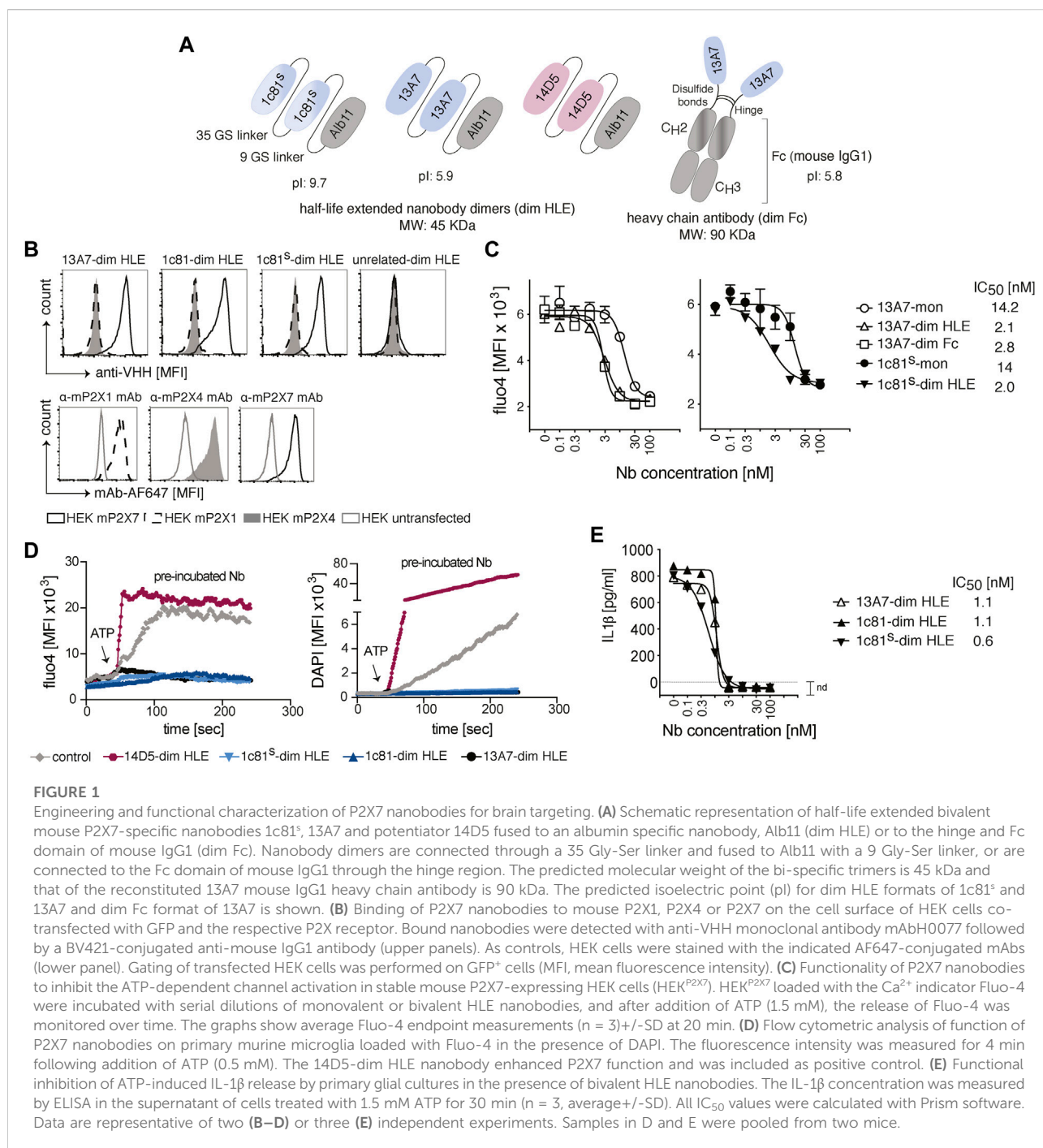
Frozen brain sections from i.c.v. injected mice (5 µm thick) were air-dried, fixed with methanol for 10 min at –20°C and washed with PBS. Autofluorescence was quenched with 50 mM NH₄Cl for 7 min at room temperature. After washing, unspecific binding was blocked with 5% BSA in PBS for 45 min at room temperature. For immunostaining, sections were rinsed with PBS and incubated with an anti-ALFA-tag nanobody-rabbit IgG in blocking solution overnight at 4°C. After washing with PBS supplement with Ca²⁺ and Mg²⁺, sections were stained with AF488-conjugated isolectin (1:100) and either a AF555-conjugated anti-rabbit IgG antibody or an AF647-conjugated anti-ALFA-tag nanobody (1:500). Sections were counterstained with Hoechst 33342 in PBS supplement with Ca²⁺ and Mg²⁺ for 45 min at room temperature and mounted with ProLong™ Gold antifade mountant (Invitrogen) on glass slides. Staining was evaluated with a THUNDER Imager 3D microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) fitted with a LED8 filter setup and a 4.2 MP sCMOS camera. Images were acquired using 40x (NA: 1.1) and 63x (NA: 1.1) objectives.

2.11 Flow cytometry

All incubations with antibodies were carried out at 4°C for 20 min, washing steps and cell-resuspension with FACS Buffer (2% BSA, 1 mM EDTA in PBS). Data was collected with a (BD-FACS-Celesta) system using Diva software, and data was analyzed using the Flowjo software (Tree Star).

2.12 Statistical analyses

All statistical analyses were performed with the SPSS package and Graph Pad Prism 5.1 software. All data are expressed as means ± SE. The student t test was used for comparison between two groups. In case of three or more groups, one-way ANOVA was used, followed by a post hoc analysis with Bonferroni's test for multiple comparisons.



3 Results

3.1 Engineering and functional characterization of nanobodies

The P2X7-specific nanobodies (Nb) used in this study were engineered as half-life extended bivalent formats of 13A7 (antagonist) (Danquah et al., 2016), a sequence optimized variant of 1c81 (antagonist) and 14D5 (allosteric enhancer)

(Danquah et al., 2016). Dimerization was conceived to increase the binding avidity and thus enhance functional potencies. The half-life extension was achieved either by C-terminal fusion to an albumin-specific nanobody Alb11 (Tjink et al., 2008) (dim HLE), or by fusion to the Fc domain of mouse IgG1 (dim Fc) (Figure 1A). Alb11 binds to the serum albumin, thereby increasing the half-life of the construct, and the Fc-region mediates a longer half-life by binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). The molecular weight of the dim HLE format is 45 kDa and that of the dim Fc format is

90 kDa. The increase in size also contributes to half-life extension by reducing renal filtration.

Previous studies reported that anti-GFP nanobodies with an isoelectric point (pI) > 8 show enhanced passage across the BBB, likely following the adsorptive mediated transcytosis mechanism (Li et al., 2012; Li et al., 2016). Therefore, we increased the pI of 1c81 by introducing two basic amino acids in framework regions 1 and 4 (Q3K, Q122K), and fusing to the C-terminus a tandem of the highly basic SNB tag (Schaffer et al., 2010) (Figure 1A).

To verify that the sequence modification did not affect the target binding of 1c81, we analyzed by flow cytometry the binding of 1c81-dim HLE, 1c81^s-dim HLE and 13A7-dim to HEK cells co-transfected with GFP and expression constructs for either mouse P2X1, P2X4 or P2X7. All engineered nanobodies bound specifically to P2X7 but not to P2X1 and P2X4 (Figure 1B). We also confirmed that the dimerization of these nanobodies increased their blocking potency. For this we monitored the ATP-induced gating of P2X7 revealed by the influx of Ca²⁺ into HEK cells stably expressing mouse P2X7 (HEKP2X7). Fluorometric analyses of Fluo-4 loaded HEKP2X7 showed that bivalent nanobodies blocked the ATP-induced Ca²⁺ influx with 7-fold higher potencies than their monovalent counterparts (Figure 1C). Since extracellular ATP also induces large pore formation in P2X7-expressing cells, we simultaneously monitored DAPI uptake and Ca²⁺ influx in adult primary microglia by real-time flow cytometry. The results showed that 13A7-dim HLE, 1c81-dim HLE and 1c81^s-dim HLE effectively blocked, during the entire time of measurement, both ATP-induced DAPI uptake and Ca²⁺ influx in microglia. In contrast, 14D5-dim HLE enhanced both ATP-induced effects in microglia (Figure 1D).

ATP binding to P2X7 also triggers a K⁺ influx that activates the inflammasome to process caspase-1 (Perregaux and Gabel, 1994). In turn, active caspase-1 cleaves Gasdermin D (GSDMD) and pro-IL-1 β into mature IL-1 β . Next, the N-terminal GSDMD forms pores in the plasma membrane that mediate the release of IL-1 β (Heilig et al., 2018). To assess whether P2X7-antagonistic bivalent HLE nanobodies block IL-1 β release by microglia, we measured by ELISA the levels of IL-1 β in the supernatant of mixed primary glial cultures primed with LPS and treated with ATP. All evaluated P2X7-antagonistic bivalent HLE nanobodies (13A7-dim HLE, 1c81-dim HLE and 1c81^s-dim HLE) inhibited the release of IL-1 β from microglia in a dose dependent fashion and with high potency (Figure 1E). Taken together, these data demonstrate that ATP-induced Ca²⁺ influx, DAPI uptake and IL-1 β release by primary mouse microglia is mediated by P2X7 and that the engineered P2X7-specific nanobodies block with high potency all these effects.

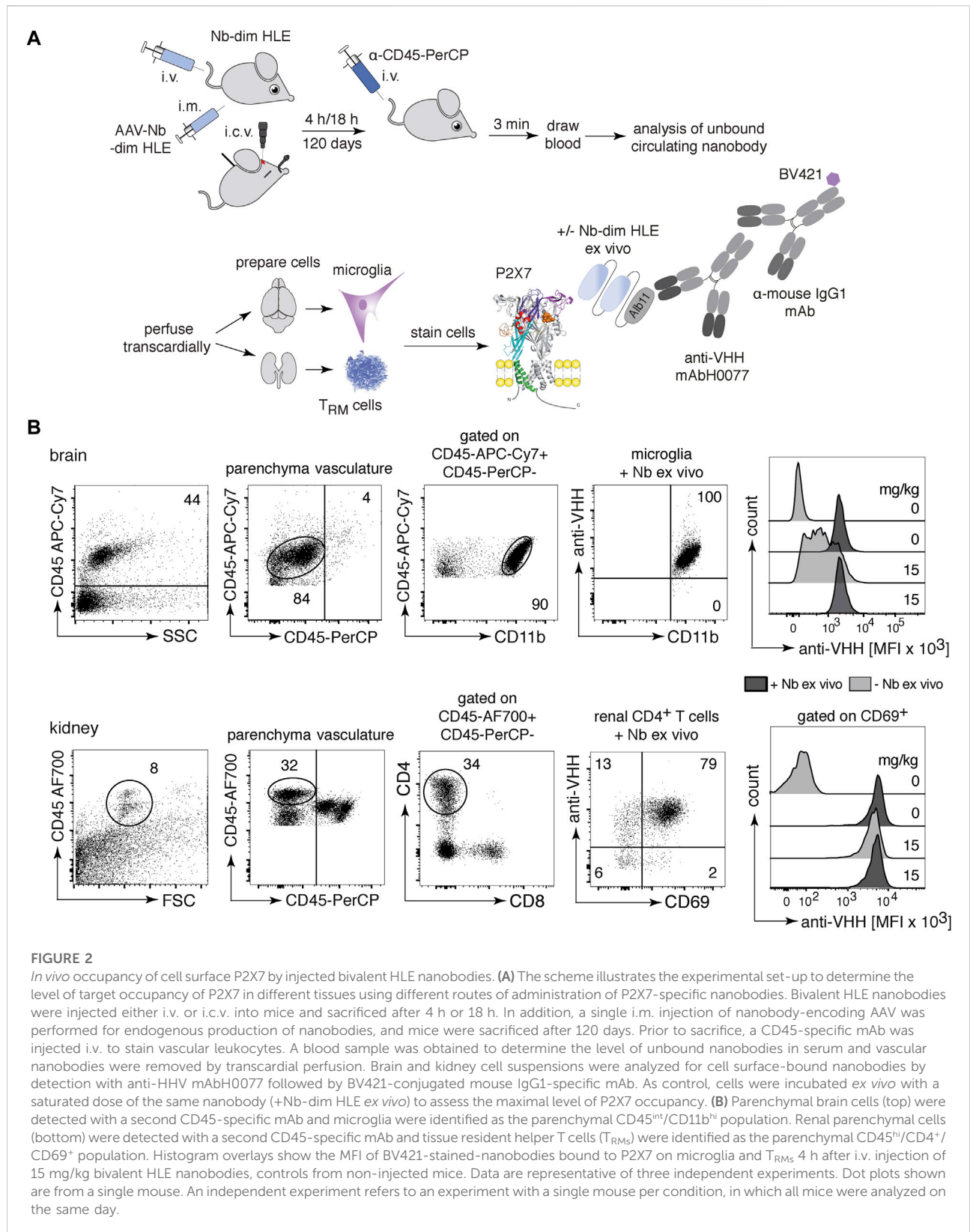
3.2 *In vivo* binding of P2X7 bivalent HLE nanobodies to immune cells in the brain and in the kidney

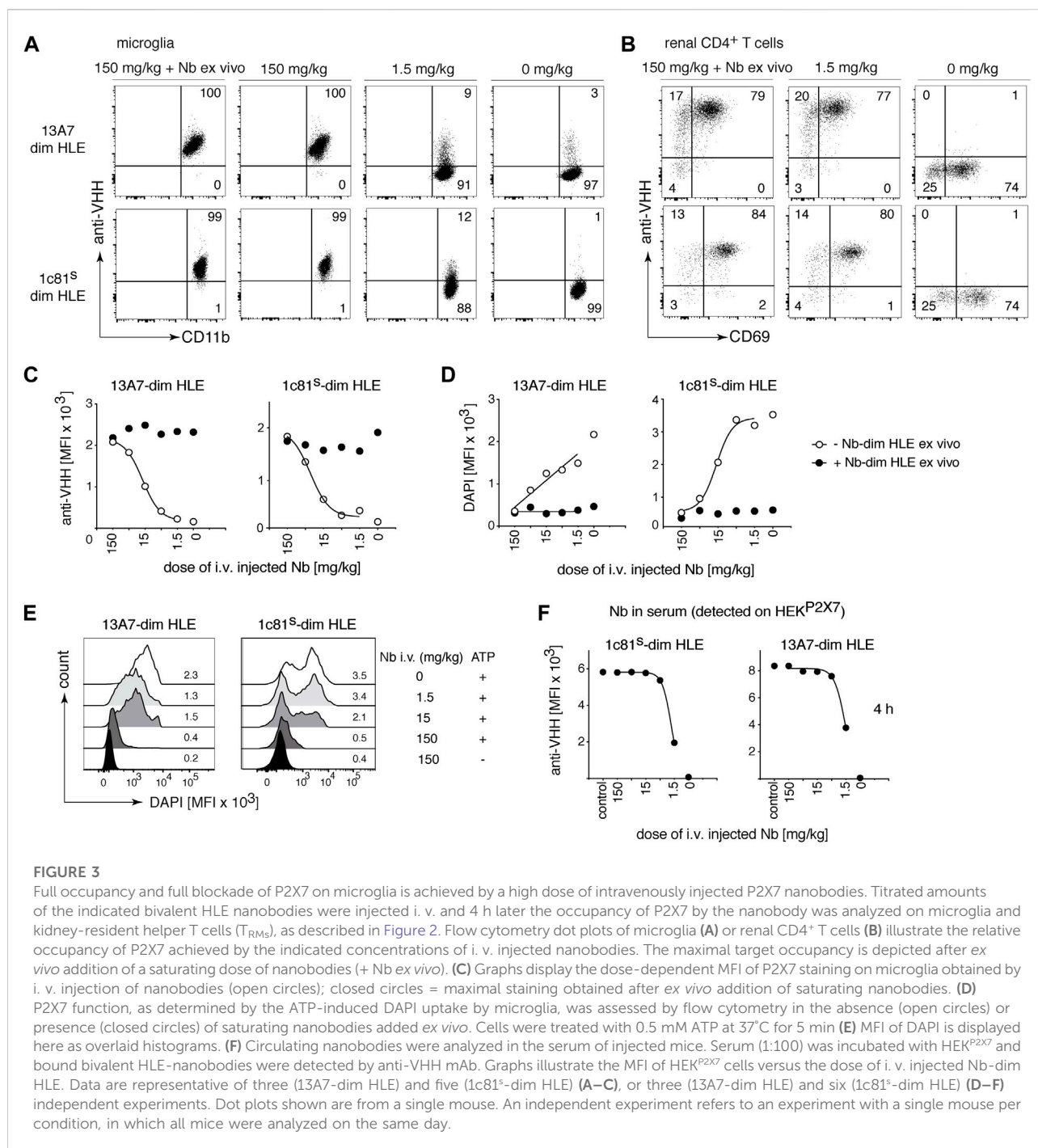
To assess the ability of P2X7-specific nanobodies to reach immune cells in various tissues following different routes of

administration, we designed a flow cytometric assay that allows detection of the injected nanobody on the cell surface of P2X7-expressing cells (Figure 2A). Briefly, purified nanobodies were injected into mice either i.v. or i.c.v. or produced endogenously after intramuscular injection of nanobody-encoding AAV. Respectively after 4 h, 18 h or 120 days of injection, we evaluated the binding of P2X7-specific nanobodies on target cells. Three minutes before sacrifice, mice were injected with a PerCP-conjugated CD45-specific mAb to label vascular immune cells and thereby distinguish them from resident cells in the parenchyma (Anderson et al., 2014). Blood samples were collected to determine the concentration of unbound soluble nanobodies in serum. Residual vascular nanobodies were removed by perfusion with PBS-heparin (Figure 2A). Cell suspensions from brain and kidney were prepared and counterstained *ex vivo* with two panels of antibodies, including a second, fluorochrome-conjugated CD45-specific mAb (Figure 2B). The degree of P2X7 occupancy achieved by the injected nanobody was analyzed on brain microglia and resident memory T cells (T_{RM}) from the kidney, two cell types known to express high levels of P2X7 (Stark et al., 2018; Borges da Silva et al., 2020) (Figure 2B). To validate this assay, we first injected i.v. 15 mg/kg of 1c81-dim HLE and analyzed the samples 4 h later. Bivalent HLE nanobodies bound to P2X7 on microglia and T_{RM}s were detected with anti-VHH mAbH0077, that binds to Alb11, followed by a BV421-conjugated mouse IgG1-specific mAb. For comparison, we determined the maximal occupancy of P2X7 by bivalent HLE nanobodies on both cell-types by incubating a separate aliquot with a saturating dose of the same nanobody construct (Figures 2A,B). The data validated the assay and demonstrated the presence of bivalent HLE nanobodies at the surface of both cell types, fully occupying P2X7 on kidney T_{RM}s and, as expected, at a lower level of occupancy on microglia (Figures 2A,B). We analyzed brain levels of bivalent HLE nanobodies for up to 7 days after i.v. injection and 28 days after i.c.v. injection. The time points shown in the following three figures correspond to those at which plateau levels of maximal P2X7 occupancy were reached in the brain.

3.3 Intravenous injection of a high dose of bivalent HLE nanobodies results in full occupancy and full blockade of P2X7 on microglia

Conventional antibodies (150 kDa), hardly penetrate the brain. In fact, only between 0.1 and 0.7% of the injected antibody dose was detected in the brain (Rubenstein et al., 2003; Abuqayyas and Balthasar, 2013; Bousquet and Janin, 2014; Bousquet et al., 2016). In case of nanobodies, it has been reported that a high pI increases brain penetration (Li et al., 2012; Li et al., 2016). To test whether the pI effect also





modulates the BBB crossing of bivalent HLE nanobodies, mice were administered i.v. with P2X7 nanobodies with a high pI (1c81^S-dim HLE) or a low pI (13A7-dim HLE) in serially titrated doses from 150 mg/kg to 1.5 mg/kg. Four hours later, nanobody binding to P2X7 on microglia in the brain (Figure 3A) and T_{RM} s in the kidney (Figure 3B) was analyzed. Both nanobodies bound to cell-surface P2X7 on microglia in a dose dependent manner (Figures 3A,C), reaching full occupancy of P2X7 on microglia

only with the highest dose (150 mg/kg) (Figures 3A,C). Following injection of the lowest dose of 1.5 mg/kg, bivalent HLE nanobodies were barely detectable on microglia. In contrast, this low dose was sufficient to fully occupy P2X7 on T_{RM} cells within 4 h after injection (Figure 3B). These results show that the pI of a bivalent HLE nanobody does not appear to be a critical determinant for brain penetration, and that penetration into the brain parenchyma requires >100-fold higher doses of i.v. injected

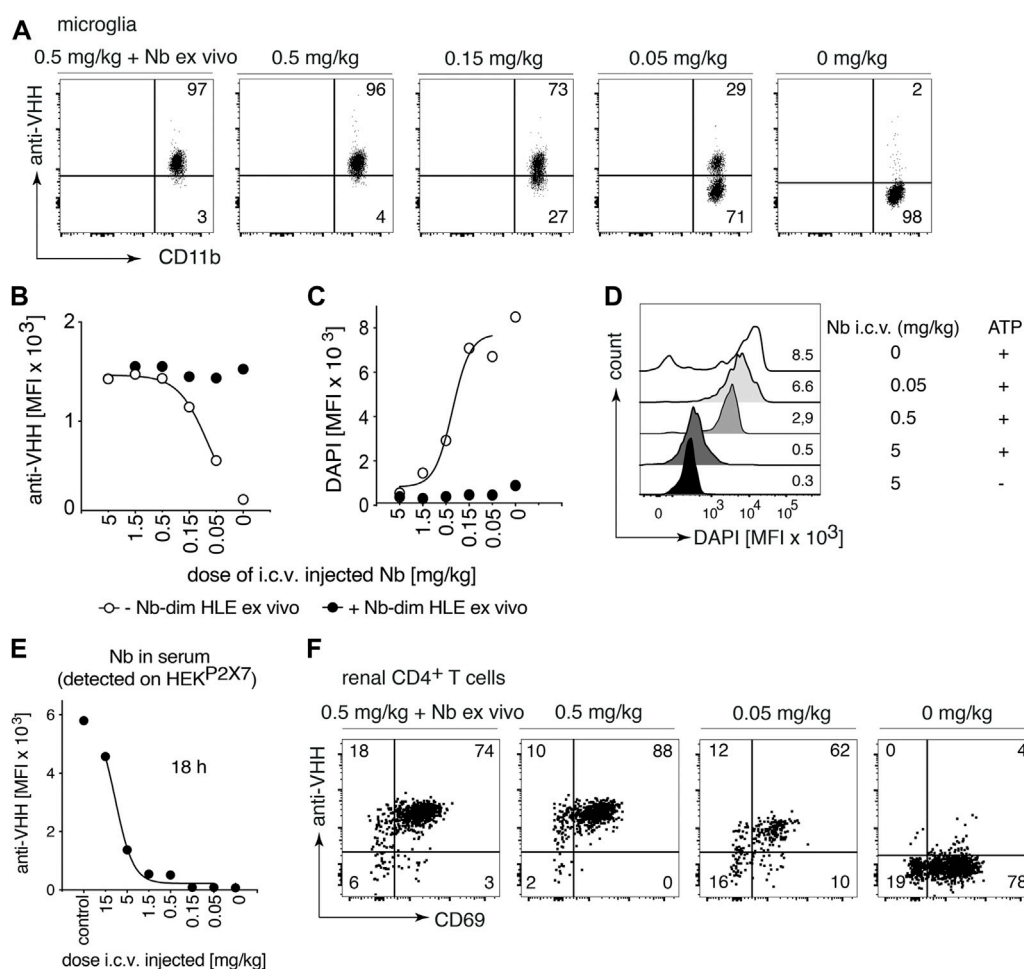


FIGURE 4

Full occupancy of P2X7 on microglia is achieved after an i.c.v. injection of a low dose of P2X7 nanobody. Titrated amounts of bivalent HLE nanobody 1c81²-dim HLE were injected i. c.v. and 18 h later the occupancy of P2X7 by the nanobody was analyzed on microglia and kidney-resident helper T cells (T_{RM}), as described in Figure 2. Flow cytometry dot plots of microglia (A) or renal CD4⁺ T cells (F) illustrate the relative occupancy of P2X7 achieved by the indicated concentrations of i. c.v. injected nanobodies versus the maximal occupancy achieved after *ex vivo* addition of saturating nanobodies (+ Nb *ex vivo*). (B) Graph displays the dose-dependent MFI of P2X7 staining on microglia obtained by i.c.v. injection of nanobodies (open circles); closed circles = maximal staining obtained after *ex vivo* addition of saturating nanobodies added *ex vivo*. (C) P2X7 function, as determined by the ATP-induced uptake of DAPI by microglia, was assessed by flow cytometry in the absence (open circles) or presence (closed circles) of saturating nanobodies added *ex vivo*. (D) MFI of DAPI displayed as overlaid histograms. (E) The presence of circulating nanobodies was evaluated in the serum of injected mice. Bivalent HLE-nanobodies in serum (1:100) bound to HEK^{P2X7} cells were detected by anti-VHH mAb. Graphs illustrate the MFI of HEK^{P2X7} cells versus the dose of i.c.v. injected Nb-dim HLE. Data are representative of four (A, B and F) or five independent experiments (C–E). Dot plots shown are from a single mouse. An independent experiment refers to an experiment with a single mouse per condition, in which all mice were analyzed on the same day.

nanobodies than those required to penetrate into the kidney parenchyma.

To evaluate the capacity of the *in vivo*-bound bivalent HLE nanobodies to block gating of P2X7 on microglia, brain cells were incubated with ATP in the presence of DAPI and the ATP-induced uptake of DAPI by microglia was measured by flow cytometry (Figure 3D). The results show a dose dependent inhibition of ATP-induced DAPI uptake by microglia (Figures 3D,E). Only the highest injected dose (150 mg/kg) achieved almost complete blockade of P2X7-mediated DAPI uptake (Figures 3D,E).

The serum levels of bivalent HLE nanobodies 4 h after i.v. administration was determined by flow cytometry assay on stable HEK-mouse P2X7 cells (HEK^{P2X7}) (Figure 3F). The results revealed that the level of unbound nanobodies in the serum of mice that had received doses higher than 5 mg/kg saturated all available P2X7 on HEK^{P2X7} cells, whereas the serum of mice that had received 1.5 mg/kg showed ~2-fold lower levels of unbound nanobodies (Figure 3F). ELISA analyses (Supplementary Figure S1A) indicate that the concentration of unbound bivalent HLE nanobodies circulating in serum at 4 h correlate with the injected

dose (Supplementary Figure S1B), revealing that approximately 60% of the injected dose was still circulating in serum 4 h after injection.

3.4 Intracerebroventricular injection of a low dose of bivalent HLE nanobodies results in full occupancy and full blockade of P2X7 on microglia

The BBB restricts the access of i.v. administered nanobodies to cells within the CNS. It has been shown that the i.c.v. route of administration was efficient to deliver nanobodies to their target throughout the brain (Gomes et al., 2018). To evaluate whether P2X7 nanobodies bind to their target on microglia following i.c.v. injection, we carried out a dose response analysis with 1c81^s-dim HLE (Figure 4). Doses from 5 mg/kg to 0.05 mg/kg were injected in a small volume (2 μ l) into a cerebral ventricle and 18 h later, binding of nanobodies to P2X7 on microglia was analyzed. The results show that a dose of 0.5 mg/kg of bivalent HLE nanobodies achieved full occupancy of P2X7 on the surface of microglia, and even the low dose of 0.15 mg/kg results in almost complete P2X7 occupancy on microglia (Figures 4A,B). A dose of 5 mg/kg sufficed to fully block ATP-induced DAPI uptake by microglia (Figures 4C,D).

To determine whether i.c.v. injected bivalent HLE nanobodies had leaked into peripheral circulation, the level of nanobodies in serum was determined indirectly by staining HEK^{P2X7} cells with these sera. The results show detectable nanobody levels in circulation which, however, do not suffice to fully occupy P2X7 on HEK^{P2X7} cells (Figure 4E). The determination of the concentration of circulating bivalent HLE nanobodies by ELISA (Supplementary Figure S1A) showed that approximately 10–30% of the injected dose was detected in serum 18 h after i.c.v. injection (Supplementary Figure S1C).

To determine whether nanobodies that had leaked into peripheral circulation also reached P2X7 on the cell surface of parenchymal T cells of the kidney, renal T_{RM} cells were analyzed for occupancy of P2X7 18 h after i.c.v. administration of 1c81^s-dim HLE (Figure 4F). The results show full occupancy of P2X7 on T_{RM} cells of the kidney after injection of doses starting at 0.5 mg/kg and higher, and a substantial occupancy already after an injection of 0.05 mg/kg (Figure 4F).

3.5 P2X7 nanobodies are detected on the cell surface of microglia on brain sections 24 h after i.c.v. administration

We next set out to directly visualize on brain sections the occupancy of P2X7 on the cell surface of microglia after i.c.v. injection of bivalent HLE nanobodies. Since the mAbH0077-based detection system did not yield signals in fluorescence microscopy, we

constructed a bivalent HLE nanobody bearing at the N-terminus the ALFA-tag (Gotzke et al., 2019). The ALFA-tagged 1c81^s-dim HLE nanobody was injected i.c.v. to mice (1.5 mg/kg), and 24 h later P2X7-bound nanobodies were detected *via* their ALFA-tag with an ALFA-specific nanobody. As controls we injected N-ter tagged 1c81^s-dim HLE into P2X7-deficient mice (Labasi et al., 2002) and P2X7-transgenic mice that overexpress a P2X7-eGFP fusion protein under the control of the endogenous P2X7 promoter (Kaczmarek-Hajek et al., 2018) (Figure 5). Our findings show that 1c81^s-dim HLE bound to the cell surface of microglia on brain cryosections of wt mice but not that of P2X7^{-/-} mice (Figure 5). Moreover, sections of P2X7-eGFP transgenic mice showed colocalization of P2X7-eGFP with the injected nanobody on microglia (Figure 5). These results confirm that the i.c.v. injection route efficiently delivers P2X7-targeting nanobodies to microglia.

3.6 A low dose of i.c.v. injected bivalent HLE nanobodies suffices to rapidly and durably occupy and block P2X7 on microglia

To study the kinetics of P2X7 occupancy on microglia by 1c81^s-dim HLE after i.c.v. administration, we injected i.c.v. into mice 1.5 mg/kg of this nanobody in 2 μ l, and analyzed P2X7 occupancy by flow cytometry at different time points from 10 min to 28 days (Figure 6). The results show, that 1c81^s-dim HLE already completely occupied all available P2X7 on microglia within 10 min after injection (Figures 6A,C). P2X7 on microglia remained fully occupied by 1c81^s-dim HLE until day 3. A steady decrease in the occupancy of microglial P2X7 by 1c81^s-dim HLE was observed in the following 2 weeks until it reached a plateau at day 21 (Figures 6A,C). Because we had previously observed that i.c.v. injected 1c81^s-dim HLE leaked into systemic circulation and reached P2X7 on the cell surface of T_{RM} cells in the kidney (Figure 4F), we analyzed P2X7 occupancy by the injected nanobody on these cells at the indicated time points. The results show that little if any 1c81^s-dim HLE had reached P2X7 on the cell surface of kidney T_{RM}s within 10 min after i.c.v. injection (Figures 6B,D). However, within the next hour, 1c81^s-dim HLE leaked into peripheral circulation, reaching full occupancy of P2X7 on T_{RM} cells at 80 min after i.c.v. injection (Figures 6B,D). Subsequently, occupancy of P2X7 on T_{RM}s declined much faster than that of P2X7 on microglia (Figures 6C,D). By day 14, P2X7 occupancy on T_{RM}s had already diminished to a low level suggesting that most of the nanobody had been cleared from the circulation (Figures 6B,D). Controls showing the *ex vivo* staining with saturating amounts of nanobodies, indicate that the levels of cell surface P2X7 remained high during the entire duration of the experiment (Figures 6C,D).

Our findings demonstrated that a single i.c.v. injection of 30 μ g 1c81^s-dim HLE leads to rapid and long-term occupancy of P2X7 on microglia (Figures 6A,C). Consistently, a long-term

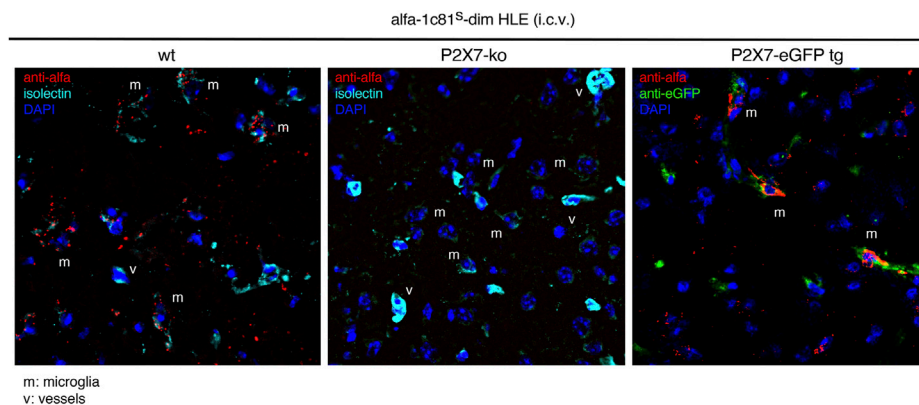


FIGURE 5

Detection of P2X7 nanobodies bound to the cell surface of microglia on brain sections. Target binding of 1c81^S-dim HLE nanobody on brain cryosections was determined 24 h following i. c.v. injection of a low dose of 0.5 mg/kg in wildtype mice. P2X7-deficient mouse and a P2X7-eGFP transgenic mouse expressing high levels of P2X7-eGFP fusion protein were used as controls. For this experiment an ALFA-tagged version of 1c81^S-dim HLE nanobody has been used, allowing detection on brain sections with an ALFA-specific nanobody (red). Microglia are stained with isolectin (cyan) and P2X7-eGFP with an eGFP-specific mouse monoclonal antibody (mAb) (green). (v) point to blood vessels brightly stained with isolectin and (m) shows microglial cells weakly stained with isolectin. Data are representative of two independent experiments. Dot plots shown are from a single mouse. An independent experiment refers to an experiment with a single mouse per condition, in which all mice were analyzed on the same day.

blockade of ATP-induced DAPI-uptake by microglia was observed up to 17 days after i.c.v. injection (Figure 6E).

In addition, the level of 1c81^S-dim HLE in serum was determined by staining of HEK^{P2X7} with sera of the injected mice (Figure 6F). The results confirmed that nanobodies were barely detectable in serum at 10 min after i.c.v. injection, but subsequently the nanobodies leaked into systemic circulation reaching maximum levels in serum at 40 min after i.c.v. injection. After this time point, the amount of 1c81^S-dim HLE in serum progressively decreased until it was no longer detectable after day 10 (Figure 6F). Notably, the levels of 1c81^S-dim HLE detected in serum show a similar time course of appearance and clearance as the levels of P2X7 occupancy on renal T_{RM} cells, with nanobody levels in serum peaking a few minutes earlier than on T_{RM}s (Figures 6D,F).

3.7 Intracerebral injection of an AAV1 encoding 13A7-dim Fc results, 28 days later, in a complete functional blockade of P2X7 on microglia and splenic T cells

We have recently shown that AAV-mediated *in vivo* delivery of nanobody-encoding genes is an effective alternative route for nanobody administration, i.e., by endogenous production of nanobodies by AAV transduced muscle cells (Gonde et al., 2021). To determine whether nanobodies endogenously produced in the brain can reach P2X7 on the surface of microglia, we injected i.c.v or intracisterna magna (i.c.m.) an

AAV1 vector coding for the P2X7-blocking 13A7-dim Fc (Figure 1A) (Gonde et al., 2021). P2X7 blockade of DAPI-uptake was evaluated on microglia 28 days after injection of AAV1 coding for 13A7-dim Fc (Figure 7A). The results show a marked ATP-induced uptake of DAPI by microglia of control animals but not of mice injected with AAV1 coding for 13A7-dim Fc (Figure 7B). Similar effects were observed for splenic T cells (Figure 7C), indicating that nanobodies that were produced in the brain had also entered the circulation and reached the spleen. These results reveal the ability of the AAV1 to transduce cells within the CNS, which mediated the *in vivo* production and delivery of nanobodies both locally to microglia in the CNS and systemically to T cells in the spleen.

3.8 Complete P2X7 inhibition on microglia was achieved 120 days after i.m. injection of AAV1-encoding 13A7-dim Fc, and almost full P2X7 occupancy after injection of AAV1-encoding 13A7-dim HLE

Since our results indicate that a very high systemic dose of nanobodies (150 mg/kg) is required to detect effective brain uptake, we next sought to determine the effect of long-term endogenous production of nanobodies by AAV-transduced muscle cells. We injected into the gastrocnemius muscle AAV1 coding for P2X7 nanobodies in two bivalent formats, 13A7-dim HLE and 13A7-dim Fc (Figure 1A). The level of P2X7 occupancy by the endogenously produced nanobody-constructs was analyzed on microglia and T_{RM} cells of the

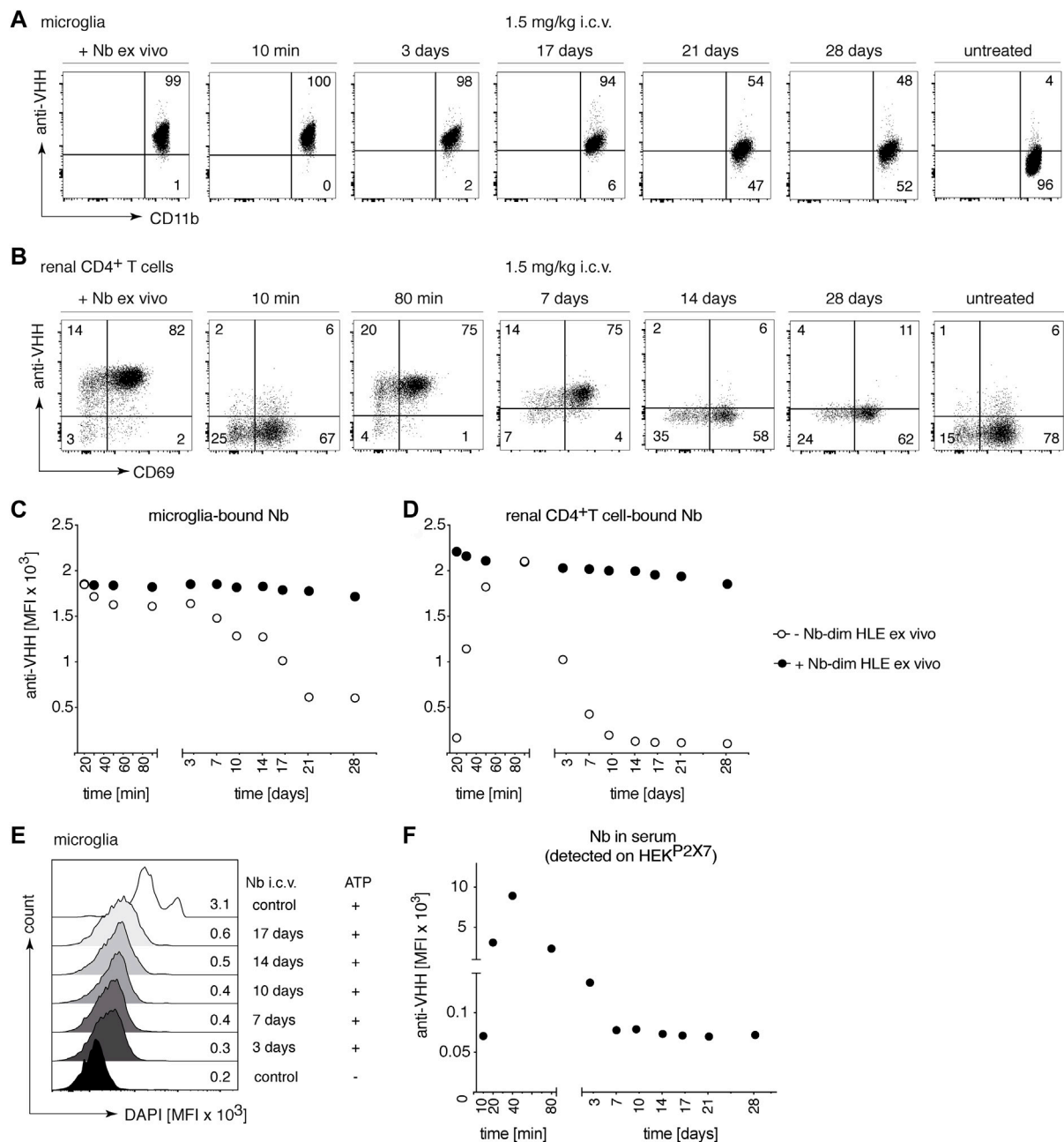
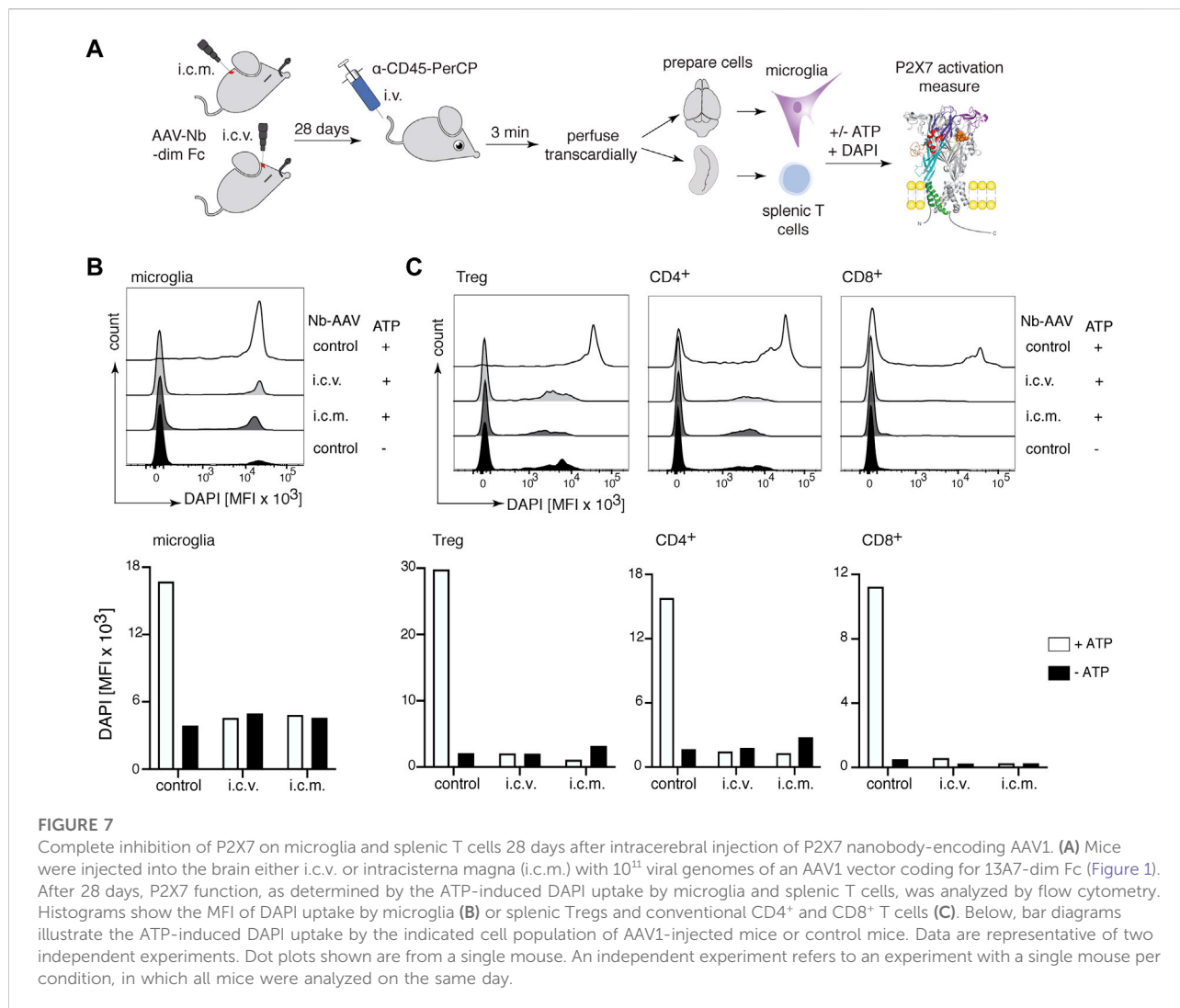


FIGURE 6

Long-term occupancy and blocking of P2X7 on microglia are achieved after a single i.c.v. injection of a low dose of P2X7 nanobody. Mice were injected i.c.v. with 1.5 mg/kg 1c81⁵-dim HLE in 2 μ l volume. At the indicated time points, the occupancy of P2X7 by the nanobody was analyzed on microglia and kidney-resident helper T cells (T_{RM}), as described in Figure 2. Flow cytometry dot plots of microglia (A) or renal CD4⁺ T cells (B) illustrate the relative occupancy of P2X7 achieved at the indicated time points after i.c.v. injection of nanobodies versus the maximal occupancy achieved after *ex vivo* addition of saturating nanobodies (+ Nb *ex vivo*). Graphs display the time-dependent MFI of P2X7 staining on microglia (C) and renal CD4⁺ T cells (D) obtained by i.c.v. injection of nanobodies (open circles); closed circles = maximal staining obtained after *ex vivo* addition of saturating nanobodies. (E) P2X7 function, as determined by the ATP-induced DAPI uptake by microglia, was assessed by flow cytometry. Histograms display the MFI of DAPI uptake by microglia. (F) The presence of circulating nanobodies was evaluated in the serum of injected mice. Bivalent HLE nanobodies in serum (1:100) bound to HEK^{P2X7} cells were detected by anti-VHH mAb. Graph illustrates the MFI of HEK^{P2X7} cells versus the time after i.c.v. injection of Nb-dim HLE. Data are representative of five (A–D and F) or four independent experiments (E). Dot plots shown are from a single mouse. An independent experiment refers to an experiment with a single mouse per condition, in which all mice were analyzed on the same day.



kidney 120 days after AAV-transduction (Figure 8). The results show that 13A7-dim HLE had achieved a substantial coverage of P2X7 on microglia (Figure 8A) and complete P2X7 occupancy on kidney T_{RM} cells (Figure 8B). Consistently, the sustained *in vivo* expression of 13A7-dim HLE led to a significant, albeit only partial blockade of ATP-induced DAPI-uptake by microglia. Interestingly, endogenously produced 13A7-dim Fc completely blocked P2X7 function on microglia (Figure 8C). In addition, levels of 13A7 dim-HLE in serum were analyzed indirectly by staining of HEK^{P2X7} cells with sera from AAV-transduced mice (Figure 8D) and by ELISA (Supplementary Figure S1A,D). The results indicate that the serum contained saturating amounts of antibodies even after 120 days of i.m. injection of nanobody encoding AAV. Together, AAV1-nanobody delivery in the muscle provides sufficient high systemic levels of nanobodies to reach P2X7 on the cell surface of microglia in the brain.

4 Discussion

In the present study we show that P2X7 expressed on the cell surface of microglia can be effectively targeted by intracerebroventricular injection of P2X7 antagonistic nanobodies, as well as by the AAV-mediated endogenous production of such nanobodies after intracerebral or intramuscular injection of nanobody-encoding AAV1.

We evaluated the brain delivery of P2X7-antagonistic nanobodies to target microglia in the brain using different routes of administration: i.v., i.c.v. and the AAV-mediated endogenous production of nanobodies after transduction of brain or muscle cells with nanobody-encoding AAVs. Two antagonistic and well characterized anti-P2X7 nanobodies were used in this study, 13A7 and 1c81, which have similar blocking potencies (Danquah et al., 2016). Bivalent formats with extended serum half-life were used, generated either by

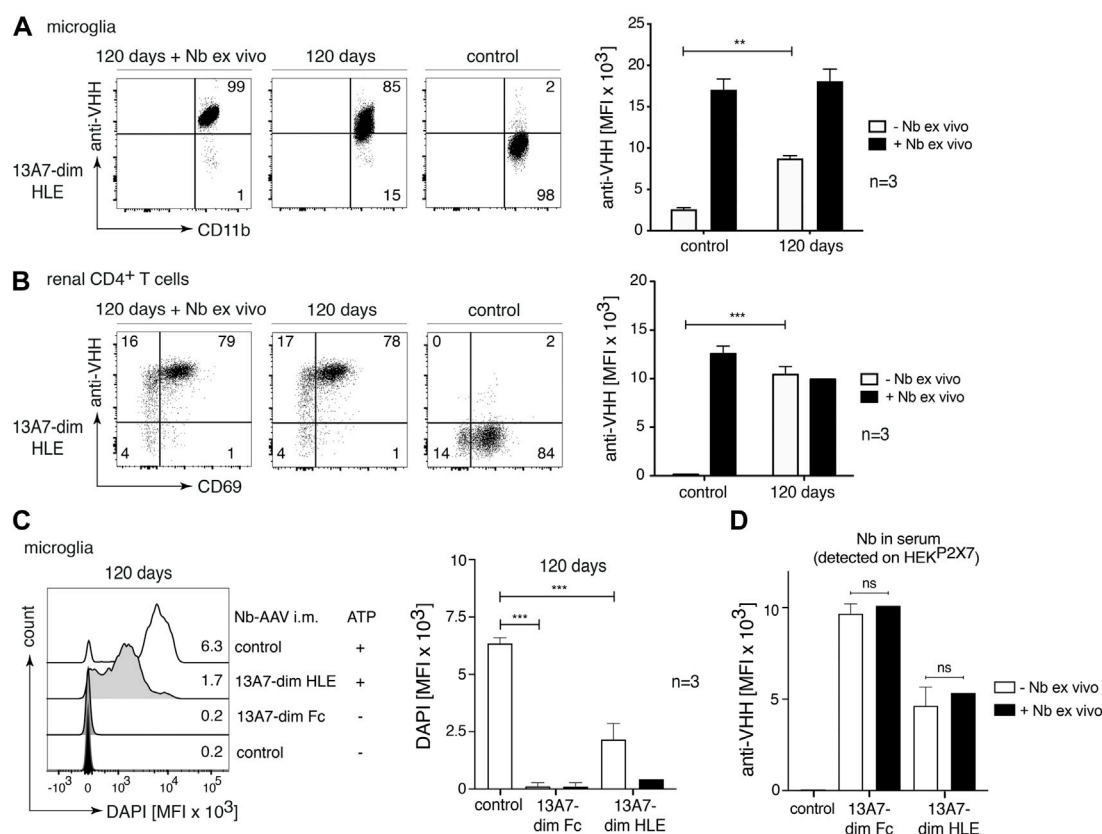


FIGURE 8

Near complete target occupancy and complete P2X7 inhibition on microglia 120 days after i.m. injection of AAV1 vectors coding for P2X7 nanobodies. Mice were injected i.m. with 10^{11} viral genomes of AAV1 coding for 13A7-dim HLE and 13A7-dim Fc. After 120 days, the occupancy of P2X7 by the nanobodies was analysed on microglia and kidney-resident helper T cells (T_{RM3}), as described in Figure 2. Flow cytometry dot plots of microglia (A) or renal CD4⁺ T cells (B) illustrate the relative occupancy of P2X7 at 120 days after i.m. injection of AAV1-Nb versus the maximal occupancy achieved after *ex vivo* addition of saturating nanobodies (+ Nb *ex vivo*). Bar diagrams illustrate the occupancy of P2X7 on microglia (A) and renal CD4⁺ T cells (B) obtained from AAV1-Nb injected and control mice ($n = 3$ /group). (C) P2X7 function, as determined by the ATP-induced uptake of DAPI by microglia, was assessed by flow cytometry. Bar diagrams illustrate DAPI uptake by microglia from three AAV1-Nb injected and three control mice in the absence (- Nb *ex vivo*) or presence (+ Nb *ex vivo*) of saturating nanobodies added *ex vivo*. (D) Circulating nanobodies were measured in the serum of transduced mice. Serum (1:100) was incubated with HEK^{P2X7} cells. Bound 13A7-dim HLE nanobodies were detected by anti-VHH mAb and BV421-conjugated IgG1-specific mAb, and bound 13A7-dim Fc nanobodies by BV421-conjugated IgG1-specific mAb. Bar diagrams illustrate the MFI of HEK^{P2X7} cells from AAV1-Nb injected and control mice ($n = 3$ /group). Dot plots shown are from a single mouse. An independent experiment refers to an experiment with a single mouse per condition, in which all mice were analyzed on the same day.

fusion to the hinge and Fc domain of mouse IgG1, or by fusion to an albumin-specific nanobody. The intravenous route is the easiest to translate to the clinic but also proved to be the least effective. Very high amounts of nanobodies were necessary to achieve coverage of P2X7 on microglia. The i.c.v. route was most effective, achieving rapid and long-term coverage of P2X7 on microglia after injection of very low doses. However, as a highly invasive procedure, this would be restricted to exceptional cases in the clinic. A single injection of nanobody encoding AAV1 into either the skeletal muscle or the cerebrospinal fluid also provided effective and long-term delivery of P2X7-blocking nanobodies to microglia in the brain. A major problem of this mode of application is the difficulty to control the levels

and duration of antibody production *in vivo*. Moreover, due to the induction of a host antibody response directed against the AAV capsid, this mode of application is limited, at best, to a single injection per AAV serotype.

It is well known that the BBB restricts the passage of intravenously injected therapeutic proteins from the circulation into the brain. Preclinical studies in mice showed that only a small fraction of antibodies reaches the brain after intravenous injection (e.g., 0.7% of the injected dose of 8 mg/kg) (Abuqayyas and Balthasar, 2013). In humans treated intravenously with therapeutic antibodies trastuzumab or rituximab, the concentrations in the cerebrospinal fluid reached around 0.1–0.2% of the serum concentration (Rubenstein et al., 2003; Bousquet and Janin, 2014). In

addition, it has been shown that the access to the brain of systemically administered anti-rabies nanobodies is dependent on the dose and the half-life of the nanobody construct. Thus, a high dose (75 mg/kg) of intraperitoneally injected half-life extended rabies nanobodies rescued mice from disease (Terry et al., 2014). Our results are consistent with these studies. We showed that intravenously injected nanobodies required a very high dose (150 mg/kg) in order to effectively cover P2X7 on microglia within the brain parenchyma. Previous studies reported that nanobodies with a high pI show better translocation into the brain than the corresponding variants with a lower pI (Li et al., 2012; Li et al., 2016). However, in the case of the high pI nanobody 1c81^s, intravenous injections did not result in an improved access to microglial cells in the brain parenchyma. A possible explanation for the discrepancy between our and previous findings could be the different sizes of the nanobody constructs that were used, i.e., monomeric nanobodies (15 kDa) (Li et al., 2012; Li et al., 2016), three times smaller than those used in our study (bivalent half-life extended nanobodies, 45 kDa). Fusion of the P2X7-blocking nanobodies to a ligand for a receptor or molecule that induce transcytosis across the BBB would be a conceivable option for improving brain uptake of systemically injected proteins, e.g., fusion to a transferrin receptor binding agent (Niewoehner et al., 2014; Haqqani et al., 2018; Wouters et al., 2020; Stocki et al., 2021).

As expected, using the intracerebroventricularly route, a 100-fold lower dose of 1c81^s-dim HLE (0.5 mg/kg) was sufficient to achieve complete occupancy and blockade of P2X7, which lasted up to 3 weeks after injection. Notably, 10 min after i.c.v. injection, P2X7 was already completely occupied on microglial cells in the brain. Interestingly, we found that i.c.v. injected nanobodies also bound to P2X7 on peripheral parenchymal CD4⁺ T cells of the kidney, indicating that the i.c.v. injected nanobody rapidly reached the blood circulation. Renal parenchymal CD4⁺ T cells revealed complete occupancy of P2X7 by the i.c.v. injected nanobody within 80 min, which lasted up to 7 days.

Furthermore, and consistent with the observed relatively low levels of circulating nanobodies in serum, the occupancy of P2X7 by the injected nanobody faded more rapidly on parenchymal renal CD4⁺ T cells than on microglia. These findings are consistent with the notion that proteins are cleared from the CSF to blood circulation *via* arachnoid projections and lymphatic vessels (Ma et al., 2017; Hladky and Barrand, 2018).

Finally, our study evaluated the capacity of endogenously produced nanobodies to reach P2X7 on microglia. In a previous study we had shown that AAV-mediated delivery of nanobody-encoding genes into the skeletal muscle results in long term endogenous production of nanobodies by the AAV-transduced muscle cells (Gonde et al., 2021). Here we show that a single injection of a heavy chain antibody-encoding AAV1 into the intracerebral ventricle or the cisterna magna results in an efficient production of the antibodies in the brain, leading to a full functional blockade of P2X7 within at least 28 days. Moreover, even a single

intramuscular injection of AAV1 coding for 2 different formats of P2X7 nanobodies (dim-Fc or dim-HLE) achieved a strong functional blockade of P2X7 on microglia 120 days after transduction. The slightly more effective blockade achieved by the heavy chain antibody (dim-Fc) in comparison to the bivalent-HLE (dim-HLE) could reflect differences in endogenous production or longer serum half-life in mice.

In conclusion, our data provide new and deeper insights into the conditions (route, dose, and time of administration) for nanobody-mediated targeting of P2X7 on microglia. Our results suggest that, in particular, the nanobody-encoded AAV delivery, either intracerebral or intramuscular, could be a promising new therapeutic strategy for the treatment of sterile brain inflammation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Hamburger Behörde für Justiz und Verbraucherschutz: G12/130, N006/2018, 021/18 and French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation: APAFIS #27816.

Author contributions

FK-N, CP-E designed the study. CP-E, CG, BR, MW, EJ, NS, MJ, NL, NW, CS, Y-VT, and SA conducted the experiments. All authors contributed to the planning and the analysis of the study. CP-E and FK-N wrote the manuscript.

Funding

This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft as parts of the Forschergruppe 2879 (A1 to TM and FK-N), the Sonderforschungsbereich 1192 (B5 to FK-N and NW), the Sonderforschungsbereich 1328 (Project-ID: 335447717, Z02 to FH, BR and FK-N, A15 to AN) and a tandem DFG/ANR grant (No310-13 to FKN and ANR-18-CE92-0046 to SA).

Acknowledgments

The authors thank Gudrun Dubberke, Fabienne Seyfried and Natalie Tode, Institute of Immunology, and Jasmin

Pabla, Karolyn Gustmann and Oliver Schnapauff, Department of Neurology for their excellent technical assistance with production and purification of recombinant nanobodies, and in the handling of mice. The authors thank Prof. Victor Puelles and his group, UKE III. Medical Department, for access and technical assistance with the Thunder Imager 3D microscope, and the UKE Microscopy Imaging Facility, for assistance with image editing. The authors thank Prof. Eva Tolosa, Institute of Immunology, and Prof. Victor Puelles for critical review of the manuscript.

Conflict of interest

FK-N and CS are co-inventors of a patent covering P2X7-antagonistic nanobodies.

The remaining authors declare(s) 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/fphar.2022.1029236/full#supplementary-material>

References

- Abuqayyas, L., and Balthasar, J. P. (2013). Investigation of the role of FcγR and FcRn in mAb distribution to the brain. *Mol. Pharm.* 10, 1505–1513. doi:10.1021/mp300214k
- Anderson, K. G., Mayer-Barber, K., Sung, H., Beura, L., James, B. R., Taylor, J. J., et al. (2014). Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat. Protoc.* 9, 209–222. doi:10.1038/nprot.2014.005
- Andrejew, R., Oliveira-Giacomelli, A., Ribeiro, D. E., Glaser, T., Arnaud-Sampaio, V. F., Lameu, C., et al. (2020). The P2X7 receptor: central hub of brain diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 124. doi:10.3389/fnmol.2020.00124
- Bartlett, R., Stokes, L., and Sluyter, R. (2014). The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol. Rev.* 66, 638–675. doi:10.1124/pr.113.008003
- Bhattacharya, A., and Biber, K. (2016). The microglial ATP-gated ion channel P2X7 as a CNS drug target. *Glia* 64, 1772–1787. doi:10.1002/glia.23001
- Borges da Silva, H., Peng, C., Wang, H., Wanhainen, K. M., Ma, C., Lopez, S., et al. (2020). Sensing of ATP via the purinergic receptor P2RX7 promotes CD8+ trm cell generation by enhancing their sensitivity to the cytokine TGF-β. *Immunity* 53, 158–171. doi:10.1016/j.immuni.2020.06.010
- Bousquet, G., Darrouzain, F., de Bazelaire, C., Ternant, D., Barranger, E., Winterman, S., et al. (2016). Intrathecal trastuzumab halts progression of CNS metastases in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 34, e151–e155. doi:10.1200/JCO.2012.44.8894
- Bousquet, G., and Janin, A. (2014). Passage of humanized monoclonal antibodies across the blood-brain barrier: relevance in the treatment of cancer brain metastases? *J. Appl. Biopharm. Pharmacokinet.* 2, 50–58. doi:10.14205/2309-4435.2014.02.02.2
- Boutin, H., LeFevre, R. A., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., and Rothwell, N. J. (2001). Role of IL-1α and IL-1β in ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 21, 5528–5534. doi:10.1523/jneurosci.21-15-05528.2001
- Choi, H. B., Ryu, J. K., Kim, S. U., and McLarnon, J. G. (2007). Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J. Neurosci.* 27, 4957–4968. doi:10.1523/JNEUROSCI.5417-06.2007
- Choi, S. Y., and Kim, K. T. (1996). Characterization of Na⁺ influx mediated by ATP(4⁻)-activated P2 purinoceptors in PC12 cells. *Br. J. Pharmacol.* 118, 935–940. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15489.x
- Conrath, K., Vincke, C., Stijlemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., et al. (2005). Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J. Mol. Biol.* 350, 112–125. doi:10.1016/j.jmb.2005.04.050
- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., et al. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci. Transl. Med.* 8, 366ra162. doi:10.1126/scitranslmed.aaf8463
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., et al. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535, 111–116. doi:10.1038/nature18590
- Egan, T. M., and Khakh, B. S. (2004). Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci.* 24, 3413–3420. doi:10.1523/JNEUROSCI.5429-03.2004
- Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., and Kagan, J. C. (2018). The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity* 48, 35–44. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.013
- Falzone, S., Donvito, G., and Di Virgilio, F. (2013). Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus* 3, 20120101. doi:10.1098/rsif.2012.0101
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzone, S., Hanau, S., and Di Virgilio, F. (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* 185, 579–582. doi:10.1084/jem.185.3.579
- Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzone, S., Ricciardi-Castagnoli, P., and Di Virgilio, F. (1996). Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J. Immunol.* 156, 1531–1539.
- Fischer, H., Gottschlich, R., and Seelig, A. (1998). Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *J. Membr. Biol.* 165, 201–211. doi:10.1007/s002329900434
- Franke, H., Gunther, A., Grosche, J., Schmidt, R., Rossner, S., Reinhardt, R., et al. (2004). P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 686–699. doi:10.1093/jnen/63.7.686
- Gomes, J. R., Cabrito, I., Soares, H. R., Costelha, S., Teixeira, A., Wittelsberger, A., et al. (2018). Delivery of an anti-transthyretin Nanobody to the brain through intranasal administration reveals transthyretin expression and secretion by motor neurons. *J. Neurochem.* 145, 393–408. doi:10.1111/jnc.14332
- Gonde, H., Demeules, M., Hardet, R., Scarpitta, A., Junge, M., Pinto-Espinoza, C., et al. (2021). A methodological approach using rAAV vectors encoding nanobody-based biologics to evaluate ARTC2.2 and P2X7 *in vivo*. *Front. Immunol.* 12, 704408. doi:10.3389/fimmu.2021.704408
- Gotzke, H., Kilisch, M., Martinez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., et al. (2019). The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat. Commun.* 10, 4403. doi:10.1038/s41467-019-12301-7

- Grygorowicz, T., and Struzynska, L. (2019). Early P2X7R-dependent activation of microglia during the asymptomatic phase of autoimmune encephalomyelitis. *Inflammopharmacology* 27, 129–137. doi:10.1007/s10787-018-0528-3
- Grygorowicz, T., Welniak-Kaminska, M., and Struzynska, L. (2016). Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Cell. Neurosci.* 74, 1–9. doi:10.1016/j.mcn.2016.02.003
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., et al. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448. doi:10.1038/363446a0
- Haqqani, A. S., Delaney, C. E., Brunette, E., Baumann, E., Farrington, G. K., Sisk, W., et al. (2018). Endosomal trafficking regulates receptor-mediated transcytosis of antibodies across the blood brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 38, 727–740. doi:10.1177/0271678X17740031
- He, Y., Taylor, N., Fourgeaud, L., and Bhattacharya, A. (2017). The role of microglial P2X7: modulation of cell death and cytokine release. *J. Neuroinflammation* 14, 135. doi:10.1186/s12974-017-0904-8
- Heilig, R., Dick, M. S., Sborgi, L., Meunier, E., Hiller, S., and Broz, P. (2018). The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *Eur. J. Immunol.* 48, 584–592. doi:10.1002/eji.201747404
- Hladky, S. B., and Barrand, M. A. (2018). Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 15, 30. doi:10.1186/s12987-018-0113-6
- Jin, J. J., Kim, H. D., Maxwell, J. A., Li, L., and Fukuchi, K. (2008). Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 23. doi:10.1186/1742-2094-5-23
- Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., et al. (2018). Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife* 7, e36217. doi:10.7554/eLife.36217
- Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., et al. (2002). Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J. Immunol.* 168, 6436–6445. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6436
- Li, T., Bourgeois, J. P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A. M., Mecheri, S., et al. (2012). Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J.* 26, 3969–3979. doi:10.1096/fj.11-201384
- Li, T., Vandesquille, M., Koukoulis, F., Duffeffant, C., Youssef, I., Lenormand, P., et al. (2016). Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for *in vivo* imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J. Control. Release* 243, 1–10. doi:10.1016/j.jconrel.2016.09.019
- Ma, Q., Ineichen, B. V., Detmar, M., and Proulx, S. T. (2017). Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice. *Nat. Commun.* 8, 1434. doi:10.1038/s41467-017-01484-6
- Matute, C., Torre, I., Perez-Cerda, F., Perez-Samartin, A., Alberdi, E., Etxebarria, E., et al. (2007). P2X7(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci.* 27, 9525–9533. doi:10.1523/JNEUROSCI.0579-07.2007
- Maysami, S., Wong, R., Pradillo, J. M., Denes, A., Dhungana, H., Malm, T., et al. (2016). A cross-laboratory preclinical study on the effectiveness of interleukin-1 receptor antagonist in stroke. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 36, 596–605. doi:10.1177/0271678X15606714
- McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G., and Choi, H. B. (2006). Upregulated expression of purinergic P2X7(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 1090–1097. doi:10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3
- Melani, A., Amadio, S., Gianfriddo, M., Vannucchi, M. G., Volonte, C., Bernardi, G., et al. (2006). P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 26, 974–982. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600250
- Melani, A., Turchi, D., Vannucchi, M. G., Cipriani, S., Gianfriddo, M., and Pedata, F. (2005). ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during *in vivo* ischemia. *Neurochem. Int.* 47, 442–448. doi:10.1016/j.neuint.2005.05.014
- Metzger, M. W., Walser, S. M., Aprile-Garcia, F., Dedic, N., Chen, A., Holsboer, F., et al. (2017). Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. *Purinergic Signal.* 13, 153–170. doi:10.1007/s11302-016-9546-z
- Moller, S., Jung, C., Adriouch, S., Dubberke, G., Seyfried, F., Seman, M., et al. (2007). Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. *Purinergic Signal.* 3, 359–366. doi:10.1007/s11302-007-9084-9
- Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2000). Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.* 19, 921–930. doi:10.1093/emboj/19.5.921
- Nicke, A. (2008). Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 803–808. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.042
- Niewoehner, J., Bohrmann, B., Collin, L., Ulrich, E., Sade, H., Maier, P., et al. (2014). Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* 81, 49–60. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.061
- Partridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
- Perregaux, D., and Gabel, C. A. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269, 15195–15203. doi:10.1016/s0021-9258(17)36591-2
- Rampe, D., Wang, L., and Ringheim, G. E. (2004). P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *J. Neuroimmunol.* 147, 56–61. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.10.014
- Recourt, K., van der Aart, J., Jacobs, G., de Kam, M., Drevets, W., van Nueten, L., et al. (2020). Characterisation of the pharmacodynamic effects of the P2X7 receptor antagonist JNJ-54175446 using an oral dexamphetamine challenge model in healthy males in a randomised, double-blind, placebo-controlled, multiple ascending dose trial. *J. Psychopharmacol.* 34, 1030–1042. doi:10.1177/026988120914206
- Rubenstein, J. L., Combs, D., Rosenberg, J., Levy, A., McDermott, M., Damon, L., et al. (2003). Rituximab therapy for CNS lymphomas: targeting the leptomeningeal compartment. *Blood* 101, 466–468. doi:10.1182/blood-2002-06-1636
- Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaiana, M., Idzko, M., Falzoni, S., et al. (2009). Activation of microglia by amyloid β requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* 182, 4378–4385. doi:10.4049/jimmunol.0803612
- Sanz, J. M., and Di Virgilio, F. (2000). Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J. Immunol.* 164, 4893–4898. doi:10.4049/jimmunol.164.9.4893
- Schaffer, U., Schlosser, A., Muller, K. M., Schafer, A., Katava, N., Baumeister, R., et al. (2010). SnAvi—a new tandem tag for high-affinity protein-complex purification. *Nucleic Acids Res.* 38, e91. doi:10.1093/nar/gkp1178
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., et al. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660–665. doi:10.1038/nature15514
- Skaper, S. D., Facci, L., Culbert, A. A., Evans, N. A., Chessell, I., Davis, J. B., et al. (2006). P2X(7) receptors on microglial cells mediate injury to cortical neurons *in vitro*. *Glia* 54, 234–242. doi:10.1002/glia.20379
- Stark, R., Wesselink, T. H., Behr, F. M., Kragten, N. A. M., Arens, R., Koch-Nolte, F., et al. (2018). TR_M maintenance is regulated by tissue damage via P2RX7. *Sci. Immunol.* 3, eaau1022. doi:10.1126/sciimmunol.aau1022
- Stocki, P., Szary, J., Rasmussen, C. L. M., Demychuk, M., Northall, L., Logan, D. B., et al. (2021). Blood-brain barrier transport using a high affinity, brain-selective VNAR antibody targeting transferrin receptor 1. *FASEB J.* 35, e21172. doi:10.1096/fj.202001787R
- Terryn, S., Francart, A., Lamoral, S., Hultberg, A., Rommelaere, H., Wittelsberger, A., et al. (2014). Protective effect of different anti-rabies virus VHH constructs against rabies disease in mice. *PLoS One* 9, e109367. doi:10.1371/journal.pone.0109367
- Tijink, B. M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter-van Walsum, M., Dreier, T., de Haard, H. J., et al. (2008). Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular nanobody technology. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2288–2297. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2384
- Veltkamp, A. W., Magnus, T., and Rissiek, B. (2022). Real-time flow cytometry as a tool to monitor cellular consequences of P2X7 activation in multiple cell populations mixed in a single FACS tube. *Methods Mol. Biol.* 2510, 291–302. doi:10.1007/978-1-0716-2384-8_16
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., et al. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 157–174. doi:10.1007/s00430-009-0116-7
- Wouters, Y., Jaspers, T., De Strooper, B., and Dewilde, M. (2020). Identification and *in vivo* characterization of a brain-penetrating nanobody. *Fluids Barriers CNS* 17, 62. doi:10.1186/s12987-020-00226-z
- Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomic, M., and Stojkovic, S. S. (2008). The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J. Gen. Physiol.* 132, 563–573. doi:10.1085/jgp.200810059

Article 3, en préparation

Time-dependent blockade of P2RX7 by AAV-producing antagonist nanobodies led to opposite phenotypes in experimental autoimmune encephalomyelitis.

Charlotte Guillou, et al. *Manuscript in preparation.*

Contexte de l'étude : Étant exprimé à la fois par les cellules du système immunitaire et du SNC, P2RX7 peut jouer un rôle important dans l'inflammation et notamment l'inflammation cérébrale... Il a été montré que l'injection d'inhibiteurs pharmacologiques de P2RX7 était efficace dans le traitement de l'EAE (Matute *et al.* 2007), faisant de P2RX7 une cible thérapeutique potentielle dans la SEP. Cependant, son rôle exact dans cette maladie n'est pas encore clair. L'objectif était donc de mieux définir ce rôle en utilisant le modèle de l'EAE chronique (induite par les peptides MOG₃₅₋₅₅) et la technologie AAVnano.

Méthodes : Des AAVnano codant pour des nanocorps (Ncs) bloquant (13A7-Fc) anti-P2RX7 ont été injectés une seule fois en intramusculaire (i.m.) ou en intracérébral (i.c.). Ensuite, nous avons étudié à différents temps après injection, la fixation du Ncs aux récepteurs P2RX7 et l'inhibition de son activité à la fois sur la microglie (SNC) et sur les lyT de la rate (Treg, lyT CD4 et CD8), par un test cytométrique (Pinto-Espinoza *et al.* 2022). Afin d'étudier le potentiel thérapeutique de P2RX7 dans l'EAE chronique, les AAVnano ont été injectés i.m. 21 jours avant ou 4 jours après l'immunisation des souris.

Principaux résultats : Nous avons observé que l'administration d'AAVnano soit en i.m. ou en i.c. inhibait complètement l'activation du P2RX7 en périphérie (*i.e.* lyT spléniques) dès 1 semaine après injection. Dans le cadre du SNC, l'injection i.c. permettait un blocage plus rapide que l'injection i.m. (respectivement 2 semaines contre 3 semaines), mais *in finé*, le blocage induit suite à une injection i.m. était plus important. Concernant notre étude du rôle de P2RX7 dans l'EAE, nous avons obtenu des phénotypes opposés selon la cinétique de blocage. En effet, si l'AAVnano était injecté en i.m. 3 semaines avant l'induction de la maladie, une exacerbation de l'EAE chez les souris traitées a été observée ; elle est accompagnée d'un score histopathologique plus important (*i.e.* une augmentation de l'infiltrat cellulaire, de la microglie et des astrocytes activés, une hyper-activation des lyT pathogéniques (Th17 et Th17.1) dans le cerveau). Mais au contraire, si l'on administrait les AAVnano 4 jours après l'induction de l'EAE, les souris traitées présentaient une amélioration du phénotype.

Conclusion : Cette étude met en évidence le potentiel des Ncs comme nouvelle classe de produits biologiques pouvant être utilisés, pour moduler la fonction d'une cible *in vivo*, et qui possèdent la capacité de traverser la BHE. De plus, nos résultats démontrent que la méthodologie AAVnano permet

de délivrer des molécules thérapeutiques vers le SNC. Finalement, nous montrons un aspect à la fois bénéfique et délétère de P2RX7 au cours de l'EAE. En effet, nos études précliniques, soit en condition prophylactique ou curative, montrent que le blocage de P2RX7 à différentes phases de la maladie peut induire des effets opposés. Cela reflète la complexité des effets immunomodulateurs de ce récepteur.

**Time-dependent blockade of P2RX7 by AAV-producing antagonist nanobodies
led to opposite phenotypes in experimental autoimmune encephalomyelitis**

Guillou, C. *et al.* Manuscript in preparation

****Corresponding Author:***

Yossan-Var Tan

INSERM U1234 - PANTHER - IRIB

Université de Rouen Normandie – UFR Santé

Bâtiment Recherche - 3^{ème} étage

22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France

E-mail: yossan-var.tan@univ-rouen.fr

Phone: +33 2 35 14 82 33

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune and demyelinating disease of the central nervous system (CNS), characterized by axonal and neuronal degeneration. Current treatments remain ineffective during its progressive phase. Thus, there is a great need to discover new therapeutic targets. P2X7 receptor (P2RX7) is: (1) a cell surface ion channel that senses ATP released from cells as a danger signal during stress, inflammation and tissue damage and (2) is largely implicated during inflammatory events, promoting NLRP3 inflammasome assembly, pro-inflammatory cytokine production, and regulating lymphocyte differentiation and survival. To better understand its role in the pathophysiology of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE, mouse model of MS), we used the AAVnano technology based on AAV vectors as a delivery system for single-chain antibodies (*i.e.* nanobodies, Nbs) specifically targeting P2RX7. Here, we used AAV1 coding for P2RX7 antagonistic 13A7-Fc Nbs (AAV1-13A7-Fc vectors). When AAV were intramuscularly (i.m.) administered before EAE manifestation, we observed an unexpected and more severe EAE disease in the AAV- vs. PBS-treated group, accompanied by: (i) exacerbated CNS histopathological features such as demyelination, immune cell infiltration, reactive microgliosis and astrogliosis, and (ii) hyperactivation of both pathogenic Th17 and Th17.1 cells. On the contrary, when administered four days after EAE induction, AAV-treated mice exhibited alleviated EAE pathology, with: (i) reduced T cell recruitment to the CNS, (ii) altered stimulation and/or generation of peripheral autoreactive Th1 and Th17, and (iii) a significant reduction of the expression of key inflammatory factors. These data are in adequation with our initial hypothesis stating a detrimental role of P2RX7 functions.

In conclusion, our findings highlight both beneficial and detrimental aspects of P2RX7 during the pathophysiology of EAE and provide the proof-of-concept that a

P2RX7-antagonistic nanobody may be used as potent therapeutic biologic in MS and other related inflammatory/neurodegenerative disorders. Moreover, they support the use of AAVnano as a promising strategy to deliver therapeutic molecules to the CNS in either prophylactic vs. curative conditions.

Keywords: MS, EAE, P2RX7, AAV, nanobody, neuroinflammation

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a multi-component autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by inflammation, neurodegeneration and failure of CNS repair mechanisms. MS is initially characterized by episodes of acute symptoms, followed by partial or complete recovery (relapsing-remitting MS, RRMS), until remissions no longer occur and disability continuously progresses (progressive MS, PMS). Despite its complex pathogenesis, evidence supports a Th1/Th17 autoimmune component of the disease driving chronic inflammation in the spinal cord and brain. Thus, a vast number of MS therapies are immunomodulatory in nature. However, current treatments are only partially effective at the earliest phases (*i.e.* RRMS) of the pathology with certain important side effects, and do not halt the progressive phase (*i.e.* PMS) of the disease. Therefore, there is an urgent need for the discovery of new therapeutic targets in MS, capable not only of blocking inflammation, but also of promoting axon integrity/regeneration, neuron survival and remyelination.

In the context of stress, inflammation and tissue damage, cells released endogenous danger signals such as ATP and NAD⁺ [1-4]. Particularly, cells of the immune system are equipped with sensors for these extracellular molecules. Among them, the P2X7 ion channel has sparked interest because of its role in triggering the release of proinflammatory cytokines and in inducing regulatory T cell death [5-7]. The P2X7 receptor (P2RX7) is a homotrimeric ion channel [7-10] gated by extracellular ATP and by NAD⁺-dependent ADP-ribosylation, a post-translational modification catalyzed by ARTC2, a toxin-related ecto-enzyme [11, 12]. Ligand-binding induces a conformational change that allows influx of Ca²⁺ and Na⁺ ions and efflux of K⁺ ions [10]. P2RX7 is known as a key mediator of inflammation. Indeed, its activation on T cells causes exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane and metalloprotease-mediated ecto-domain

shedding of CD62L [11, 13, 14]. P2RX7 activation on macrophages induces the assembly of the NLRP3 inflammasome and caspase-1-mediated cleavage and release of the mature proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 [7]. In addition, a prolonged exposure to ATP or a brief exposition to NAD⁺ causes P2RX7-dependent pore formation [15], membrane blebbing and - ultimately - cell death [11, 16]. Interestingly, P2RX7 is upregulated in several murine chronic inflammatory models of diseases such as glomerulonephritis and MS [6, 17, 18]. Studies using P2RX7-deficient animals show reduced inflammatory responses in several experimental models of sterile inflammation, including allergic encephalitis [17] and antibody-mediated nephritis [18]. Moreover, small molecule antagonists of the ion channel including brilliant blue G (BBG) and oxidized ATP (oATP) have shown therapeutic effects in these models [17, 18]. In EAE, an animal model of MS, the same antagonists of the ion channel given at the peak of the disease attenuate disease scores and ameliorate recovery [17]. However, these small molecules used in those studies are fraught with lack of specificity for P2RX7 and subsequently off-target side effects [19, 20].

Our goal here is to define more precisely the role of P2RX7 in the pathophysiology of EAE disease. To this end, we approached this task using three tools:

(i) we have previously engineered P2RX7-specific nanobodies (Nbs) that we have produced and carefully selected for their remarkable functional properties (*i.e.* blocking (antagonist) or potentiating (agonist) P2RX7 activity), with little if any toxicity or immunogenicity [21]. In comparison with conventional antibodies (Abs) which are composed of two heavy and two light chains, with both chains contributing to the antigen-binding site, llamas and other camelids additionally produce Abs composed only of heavy chains [22-24]. The single antigen-binding domain of these Abs is designated VHH or nanobody (Nb) when produced as a recombinant protein. In this study, we used the 13A7-Fc antagonist Nb in a Nb-Fc format including a mutated (“LSF” mutations) sequence for

the Fc region, to improve the affinity of the Fc fusion proteins to the neonatal Fc-receptor (FcRn) and, thereby, to increase the *in vivo* half-life of the fusion protein [25].

(ii) we have established in the laboratory a novel strategy named “AAV-nano methodology” to deliver *in vivo* biological molecules. Hence, we have developed adeno-associated viral vectors 1 (AAV1) coding for 13A7-Fc blocking Nbs (AAV-nano) directed to P2RX7 targets. Following a unique intramuscular (i.m.) administration of the vectors, we have demonstrated that AAV1-mediated long-term (*i.e.* months) endogenous expression of P2RX7-blocking Nbs in the periphery [26]. Furthermore, the selected Nbs can specifically and efficiently block P2RX7 functions *in vivo*.

(iii) using this AAVnano methodology, we studied the consequences of P2RX7-targeting (*i.e.* blocking P2RX7 functions and/or the homeostasis of the cells expressing P2RX7) *in vivo* in the well-established MS mouse model of chronic MOG₃₅₋₅₅-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). We assessed the impact of this treatment on the clinical development of ongoing disease as well as on the inflammatory and neurodegeneration processes that underlie the pathogenesis of EAE.

Thus, key objectives of this study are to validate the importance of P2RX7 as a relevant target in animal models (inflammation-associated chronic autoimmune diseases), and to investigate the therapeutic efficacy of AAV-mediated continuous endogenous synthesis of P2RX7-blocking Nbs after a single intramuscular (i.m.) administration in EAE.

Material and Methods

1. Animals

All animal experiments were approved by the ethical committee for animal experimentation, CENOMEXA N°54 and the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (APAFIS 2020102811465291_V5 (#27816)). All animals used in our studies were 6–12-week-old female C57BL/6Rj mice (Janvier Laboratories, France) and kept in an SPF-free facility in individually ventilated cages under standard temperature and humidity conditions. Nest boxes and compressed cotton squares were used as nesting materials and food and water were provided *ad libitum*. Upon arrival, mice were subjected to a ten-day acclimation period before starting any experiments.

2. AAVnano injection

The P2RX7 specific antagonist nanobody (Nb) named “13A7-Fc” used in this study has been previously described [21]. Briefly, it includes two single antigen-binding domains from heavy chain antibodies that naturally exist in camelids. Those domains are fused with a mutated (*i.e.* three “LSF” mutations) sequence for the Fc region of a conventional mouse Ab (*i.e.* IgG1), to boost the *in vivo* half-life of the fusion proteins and to allow its detection with anti-13A7-Fc antibodies (*i.e.* anti-IgG1-BV421 murin mAb). Fusion of Nbs to the Fc domain yields a homodimeric 90 kDa bivalent heavy chain Ab [21]. The adeno-associated viral vector 1 (AAV1) coding for 13A7-Fc Nbs named “AAV1-13A7-Fc” were produced by Virovek (Hayward, USA). Nb-encoding AAV1 viral vectors were diluted in PBS 10^{11} vg/mice, and injected to mice through either intramuscular (*i.m.* with a 100 μ L total volume divided in four injections of 25 μ L per gastrocnemius muscle), intracerebroventricular (*i.c.v.* with 4 μ L) or intracisterna magna

(i.c.m. with 20 μ L) routes under deep isoflurane inhalation and ketamine/xylazine anesthesia.

3. 13A7-Fc Nanobody dosage

Blood was collected retro-orbitally (r.o.) at different time points after i.m. AAVnano injection, and 13A7-Fc Nb titers were measured in sera. For that, we used HEK 293 cells transiently transfected with plasmids encoding the P2RX7 protein using the Calcium Phosphate Transfection Kit (Thermofisher, Waltham, USA) according to the manufacturer's recommendations. Cells were then incubated with different concentration of purified 13A7-Fc Nb (0 to 100 μ g/mL with a 1/3 dilution factor) in order to generate a standard curve, or with diluted mice sera in order to attain levels included within the standard curve range. A BV421-conjugated anti-mouse IgG1 antibody was then used to detect the 13A7-Fc Nb. Cells were analyzed by flow cytometry using a BDFACS-LSRFortessa (BD biosciences, Le Pont de Claix France).

4. Tissue collection

For all protocols, mice were perfused transcardially with cold PBS for 10 min using a peristaltic pump at a rate of 2 ml/min. Shortly before perfusion, blood was drawn by terminal r.o. puncture.

For Nb binding and functionality tests, spleens, spinal cords and brains were collected. In our EAE studies, draining lymph nodes (DLNs), spleens, spinal cords and brains were collected. All CNS tissues used for immunofluorescence analyses were fixed in 4 % PFA, cryoprotected with 20% sucrose and embedded in OCT. For molecular studies, tissues were snap frozen in liquid nitrogen.

5. Nanobody binding and functionality tests

13A7-Fc binding and functionality tests were performed on splenocytes or CNS cells (obtained by tissue enzymatic digestion and a 30/70% Percoll gradient as below). In

order to determine 13A7-Fc binding and functionality on resident microglial cells vs. peripheral monocytes/macrophages after AAVnano i.m. injection, mice were given an r.o. injection of 100 μ L (1 μ g) of PECy7-conjugated anti-CD45 mAb 3 min before perfusion with PBS. Spleens and CNS (brain and spinal cord) tissues were collected at different time points.

For the Nb binding test, cells were incubated with or without a saturating dose of 13A7-Fc Nb at 4°C for 30 min, stained with the antibody panel specified in the supplementary Table 1.

The Nb functionality test is based on DAPI uptake and CD62L and CD27 shedding induced by P2RX7 activation by ATP (Sigma). For CNS cells from AAVnano-injected mice, these were stimulated with 0.5 mM ATP in DMEM-HEPES (25 mM) containing DAPI, in the presence or absence of 1 μ g of the same Nb at 37°C for 10 min. For splenocytes from Nb-injected mice, these were stimulated with 30 or 150 μ M of ATP in PBS containing DAPI, in the presence or absence of 1 μ g of the same Nb at 37°C for 20 min. Cells were stained with the specific antibody panel in the supplementary Table 1.

All cells were analyzed with the BDFACS-LSRFortessa (BD biosciences) flow cytometer.

6. EAE induction

EAE was induced by subcutaneous immunization in both sides of the mice, proximal to the axillary lymph nodes, with 130 μ g of MOG₃₅₋₅₅ (GL Biochem, China) emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA) and supplemented with 5 mg/mL of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, USA). In addition, mice received intraperitoneally (i.p.) 375 ng of pertussis toxin (List Laboratories, USA) on days 0 and 2 post-immunization. Mice were scored daily from 0 to 5 by two researchers blinded to

the treatments as described in [27, 28]: 0—no symptoms; 1—loss of tail tonicity; 2—wobbly gait; 3—partial paralysis of the two hind legs or complete paralysis of one hind leg; 4—complete paralysis of the two hind legs; 5—moribund state or death. Weight was assessed every other day during the course of the disease. All appropriate efforts were made to minimize animal suffering or discomfort and to use the minimal number of animals necessary to produce reliable results. Mice received an i.m. injection of either PBS (control group) or 10^{11} vg of AAVnano coding for 13A7-Fc Nb. Treatment was initiated either in prior (*i.e.* 3 weeks before EAE induction) or curative (*i.e.* 4 days after EAE induction) settings. At the peak and chronic phases of the disease (days 18-20 and 28-31 post-immunization, respectively), ketamine/xylazine-anesthetized mice were perfused with PBS and sacrificed by isoflurane anesthesia overdose. For clinical assignment, we used sets of $n = 15$ to 22 mice per group in each experiment. Representative mice ($n=8$ /per group) were chosen for cellular and molecular analyses.

7. Histological analyses

Six-micrometer sections were prepared with a Leica CM1860 cryostat and stored at -80°C . For histopathological studies, spinal cord sections were stained with hematoxylin-eosin and luxol fast blue. Histopathology was scored from 0 to 4 as follows: 0—no infiltration and no demyelination; 1—sparse immune cells in the meninges area; 2—few localized immune cell infiltrating areas reaching the parenchyma with mild demyelination; 3—multiple infiltration areas with moderate demyelination; 4—severe immune cell infiltration with severe demyelination. Scoring of at least two sections per mouse was performed by two researchers blinded to the treatment. Photographs of representative images were taken at 10X magnification with a Zeiss Axioscope microscope, and image acquisition was performed with the Zen 2 lite software.

For immunofluorescence studies, spinal cords were incubated with primary rat anti-MBP (1:500, Millipore, Burlington, USA), rat anti-GFAP (1:1000, Thermofisher scientific, USA), rabbit anti-Iba1 (1:1000, Wako, Japan) or rabbit anti-NeuN (1:2500, Abcam, UK) antibodies O/N at 4 °C. Brain sections were incubated with primary rat anti-MBP (1:500, Millipore, Burlington, USA) and rabbit anti-Iba1 (1:1000, Wako, Japan) antibodies. Then, sections were incubated with Alexa Fluor 488 or Cy.3-conjugated secondary antibodies (1:300, Jackson Immuno Research Antibodies, West Grove, USA) for 1 h at room temperature. Slides were mounted using Fluoromount-G with DAPI (Southern Biotech, Birmingham, USA). Spinal cord sections were photographed at 10X magnification using the THUNDER Imager 3D microscope (Leica Microsystems) with normal thunder treatment and LAS X navigator software. In the EAE protocol a minimum of two spinal cord sections per animal were captured for each staining.

A tiles tool was used to create images of whole spinal cord sections (EAE), which were used for measurements. Percentages of immunoreactive areas or cell numbers were quantified using ImageJ software by an operator blinded to the treatment groups.

8. Flow cytometry

Preparation of primary brain microglia, lymph node and splenocytes.

Brains were cut into small 1–5 mm pieces in DMEM containing 1 mg/ml collagenase A (Roche) and 0.01 mg/ml deoxyribonuclease type I (Sigma) and incubated for 30 min at 37°C. Tissue fragments were dissociated using a 40 µm cell strainer (Clear line Dutsher). Cell pellets were gently resuspended on 5 ml of 30% Percoll and layered onto 5 ml of 70% Percoll was used (GE healthcare). After centrifugation for 30 min at 500 g with no brake, bands corresponding to leucocytes were collected. Lymph nodes and spleens were minced in PBS or FACS buffer (PBS containing 0.05% BSA and

EDTA 2.5 mM) using a 40 µm cell strainer (Clear line Dutscher). Cells were washed and resuspended in FACS buffer.

Fluorochrome conjugated monoclonal antibodies (mAbs) that were used for flow cytometry are listed in supplementary Table 1. For extracellular staining, cells were incubated with the indicated antibodies at 4°C for 30 min. Dead-cell staining was performed using DAPI or UV-LIVE/DEAD Fixable Dead cell Stain (Thermofisher Waltham, USA). After surface staining, fixation and red blood cells lysis was performed with an RBC Lysis/Fixation Solution (Sony Biotechnology) at room temperature for 30 min. For experiments using DAPI, cells were not fixed.

Intracellular staining was performed after fixation at 4°C overnight in intracellular staining permeabilization buffer (Sony Biotechnology).

Data was collected with a (BDFACS-LSRFortessa, BD biosciences, Le Pont de Claix, France) system using Diva software, and was analyzed using the Flowjo software (Tree Star).

9. RNA extraction and real-time RT-PCR

RNA was extracted from spinal cords at the peak (18-20 days after immunization) or chronic (28-31 days after immunization) EAE phases with Trizol (Sigma, Saint Louis, USA). One µg of RNA was retrotranscribed with the ImProm-II™ Reverse Trnascrption system (Promega, Madison USA). Real-time quantitative PCRs were performed using SYBR Green I Master (Roche) in combination with specific primers (supplementary Table 2). Amplification was performed with LightCycler 480 System SW 1.5.1 (Roche) as follows: initial denaturation during 10 min at 95 °C, following with amplification : for 30 for IFN-γ, IL17, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), RANTES, TGF-β, IL-10, ASC, Caspase1, CCR5, IL-1β, IL-18 and IL-6 ; 40 cycles of 95 °C for 30 s followed by 60 °C for 30 s and 72 °C; and for TNF-α and NLRP3 : 40 cycles

of 95 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Melting curve analysis confirmed primer specificity. The calculation was normalized to the housekeeping gene HPRT according to the formula $(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{ttarget}}}/(E_{\text{normalizer}})^{\Delta C_{\text{tnormalizer}}}$ (Realtime PCR handbook from Life Technologies).

10. Antigen recall assays

Mice were sacrificed at the peak (day 18-20 after immunization) or chronic (28-31 day after immunization) phases of EAE, and axillary lymph nodes cell suspensions were prepared as above. Cells were cultured at 0.5×10^6 cells/well in 96 round-bottom well plates in complete RPMI medium (containing 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin, 2×10^{-5} M β -mercaptoethanol, and 10% FBS, 0.1 mM non-essential amino acids and 20 U/mL of mL-2) (Thermofisher scientific Waltham, USA) with 20 μ g/mL ovalbumin (OVA, Sigma) or MOG₃₅₋₅₅ (GL Biochem) for 72h. For some experiments, cells from PBS-treated EAE mice were stimulated with OVA or MOG₃₅₋₅₅ (20 μ g/mL) or CD3/CD28 (4 μ g/mL) in the presence or absence of recombinant 13A7-Fc Nbs (2.5 μ g/mL). IFN- γ and IL-17 levels were measured with ELISA kits (Invitrogen, Thermofisher Waltham, USA) following the manufacturer's protocol.

12. Western blot to study P2X7 receptor protein expression

Proteins were obtained by lysis of cell suspensions obtained from spleen or CNS (brain and spinal cord) collected from mice injected i.m. with PBS or AAV coding for 13A7-Fc Nb. HEK and HEK -P2RX7 cells were used as P2RX7 expression negative and positive controls, respectively. The extraction buffer used contained 1% Triton X-100, 5mM EDT1 and 1mM AEBSF. Samples were treated with LDS sample buffer and a reducing agent, and loaded on a Blot Bis-tris gel for migration in MOPS buffer. The following cell quantities were loaded in the gel: 0.15×10^6 cells from of HEK and HEK-P2RX7 cells,

3 x 10⁶ cells from spleen and 0.5 x 10⁶ cells from CNS tissues. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane with the iBlot transfer technology. Bands were revealed by infrared imaging with rabbit monoclonal antibodies against P2RX7 (259942, Abcam Cambridge UK) and a fluorescent secondary goat antibodies anti-rabbit IgG DyLight™800 conjugated (Thermofisher, Waltham, USA).

13. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 9 software for Windows (La Jolla, USA). For statistical test of EAE score curves, two-way ANOVA was used. For the rest of analyses, Kruskal-Wallis (when multiple groups were compared) and Mann-Whitney (for comparison between two groups) tests were used to assess significance. A significance threshold was established at p< 0.05. All data are expressed as means ± SEM.

Supplementary Table 1: antibodies for flow cytometry

Target	Clone	Fluorochrome	Supplier
For myeloid cells analysis after EAE protocol			
MHC-II	M5/114-15.2	FITC	Sony biotechnology (San jose, USA).
PD-L1	MIH7	PE	
Ly6C	HK 1-4	PercPcy5.5	
CD86	GL-1	PE-cy7	
CD11c	N418	APC	
CD3	17A2	APC-cy7	
CD45	30F11	BV510	
Ly6G	1A8	BV605	
CD68	FA-11	BV711	
CD11b	M1/70	BV786	
For lymphoid cells analysis after EAE protocol			
CD4	RM4-5	PERCP ou PERCPcy5.5	Sony biotechnology (San jose, USA).
CD62L	MEL-14	APCcy7	
CD8	53-6.7	PEcy7 ou APC-cy7	
CCR6	29-2L17	PE-Dazzle594	
CX3CR1	518001A	BV421	
CD45	30-F11	BV510	
CD27	LG.30A10	BV605 ou BV785	
CD44	1M7	BV711 ou BV785	
Foxp3	150D	PE	
GATA-3	L50-823	BV711	
T-bet	4B10	Pecy ou /PE-Dazzle594	
Ki67	16A8	FITC/BV605	
RORgt	B2D	APC	Invitrogen Waltham, USA
For nanobody binding test:			
CD45	30-F11	APC	Sony biotechnology (San jose, USA).
CD11b	M1/70	BV510	
Ly6C	HK1-4	PERCPcy5.5	
IgG1	RMG1-1	BV421	
CD4	RM4-5	APC-cy7	
CD8	53-6.7	BV605	
CD25	PC61	PE	
For nanobody functionality test:			
CNS			
CD45	30-F11	APC	Sony biotechnology (San jose, USA).
CD11b	M1/70	BV510	
Ly6C	HK1-4	PERCPcy5.5	
SPLEEN			
CD45	30-F11	PERCPcy5.5	Sony biotechnology (San jose, USA).
CD4	RM4-5	APC-cy7	
CD8	53-6.7	BV605	
CD25	PC61	PE	
CD62L	MEL-14	FITC	
CD27	MG3A10	APC	

Supplementary Table 2: primers for RT-qPCR

gene	Gene bank accession number	Primer sequence	
		sense	antisense
ASC	NM_023258	5'-GGAGTCGTATGGCTTGGAGC-3'	5'-CGTCCACTTCTGTGACCCTG-3'
Caspase1	NM_009807.2	5'-TGGTCTTGTGACTTGGAGGA-3'	5'-TGGCTTCTTATTGGCACGAT-3'
CCL2/MCP-1	NM_011333	5'-AAAAACCTGGATCGGAACCAA-3'	5'-CGGGTCAACTTCACATTCAAAG-3'
CCL5/RANTES	NM_013653	5'-ACACCACTCCCTGCTGCTTT-3'	5'-GACTGCAAGATTGGAGCACTTG-3'
CCR5	NM_009917	5'-TGGCTTCTCCACACAAACAA-3'	5'-CGGAGCTTGAGAAAAACCAG-3'
IFNγ	NM_008337	5'-TGCTGATGGGAGGAGATGTCT-3'	5'-TTTCTTTCAGGGACAGCCTGTT-3'
IL-10	NM_010548	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
IL-17A	NM_010552	5'-GGAGAGCTTCATCTGTGTCTCTG-3'	5'-TTGGCCTCAGTGTGGACA-3'
IL-18	NM_008360.2	5'-GACTCTTGCGTCAACTTCAAGG-3'	5'-CAGGCTGTCTTTTGTCAACGA-3'
IL-1beta	NM_008361.4	5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3'	5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'
IL-6	NM_010551	5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3'	5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'
NLRP3	NM_145827.4	5'-AGAGCCTACAGTTGGGTGAAATG-3'	5'-CCACGCCTACCAGGAAATCTC-3'
Tgfb1	NM_011577	5'-TGCGCTTGCAAGATTAATA-3'	5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3'
TNFα	NM_013693	5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTA-3'	5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'

Results

A single intramuscular injection of AAV1-13A7-Fc led to a continuous *in vivo* production of 13A7-Fc Nbs which specifically target P2RX7-expressing cells and to a long-term blockade of P2RX7 activity within both peripheral and CNS tissues.

In this study, we used the P2RX7 specific antagonist nanobody (Nb) named “13A7-Fc” including two single antigen-binding domains (*i.e.* bispecific format provides higher avidity and longer binding to the target receptor with increased serum half-life and cell specificity [29] from heavy chain antibodies that naturally exist in camelids. Those domains are fused with a mutated (*i.e.* three “LSF” mutations) sequence for the Fc region of a conventional mouse Ab (*i.e.* IgG1), to promote binding to the neonatal Fc receptor FcRn (that mediates transcytosis through endothelial cells and reabsorption of Ab molecules in kidney tubules) and, thereby, to boost the *in vivo* half-life of the fusion proteins [25] Figure 1A). Fusion of Nbs to the Fc domain yields a homodimeric 90 kDa bivalent heavy chain Ab [30]. These formats ensure high tissue penetration combined with rapid clearance of unbound Nbs by renal filtration [25, 29]. Moreover, we applied the AAVnano technology that we have developed allowing continued endogenous synthesis of the biologic of interest after AAV transduction of cells *in vivo* [26, 31]. In order to evaluate the kinetics of Nb production in our system, we injected intramuscularly (i.m.) the adeno-associated viral vector 1 (AAV1) coding for 13A7-Fc Nbs named “AAV1-13A7-Fc” to 7-week old female C57BL/6 mice *i.e.* AAV group (n=4 mice/time of sacrifice, 10^{11} viral genomes per mouse (vg/mouse), 25 μ L/gastrocnemius muscle for a total of 100 μ L, Figure 1A). In parallel, mice injected i.m. with PBS were used as controls (PBS group, n=4/ time of sacrifice). Then, we measured the levels of circulating 13A7-Fc Nb in the sera collected from mice at different time points (*i.e.* from

day 3 to day 98) (Figure 1A). Unbound 13A7-Fc Nbs were detected by flow cytometry using HEK cells expressing P2RX7 (on which the Nbs bind) and an anti-IgG1-BV421 murin mAb (recognizing the Fc part of the nanobodies). As expected, the results confirmed a time-dependent expression of the secreted Nbs with an initial concentration ($9.8 \pm 1.55 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) assessed as early as one week after the AAV1-13A7-Fc i.m. injection (Figure 1B). We then observed a gradual increase of 13A7-Fc concentrations reaching a plateau on day 56 post-injection at $143 \pm 13.63 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ and persisting until at least 98 days (Figure 1B).

For subsequent measurements, we sacrificed the mice at several time points from day 3 to day 98 (Figure 1A), and harvested the spleen and CNS (brain and spinal cord) tissues after intracardiac perfusion with PBS (Figure 1D and 1E). All leukocytes were stained with a CD45-APC antibody. However, in order to distinguish the specific contribution of leukocytes located within the CNS parenchyma we performed an i.v. injection of a CD45-PECy7 mAb 3 minutes before sacrifice. By this method, vascular leukocytes (*i.e.* peripheral to CNS) were CD45-PECy7⁺ mAb and CNS parenchyma leukocytes were CD45-PECy7⁻. We found by flow cytometry that the percentage of CNS parenchyma leukocytes in the CNS cell suspension preparations was above 98% (Figure 1C). In addition to the *in vivo* production of the 13A7-Fc Nbs, we monitored its binding to P2X7R flow cytometry by means of anti-13A7-Fc antibodies (*i.e.* anti-IgG1-BV421 murin mAb) (Figure 1D, as in [31]). In addition, we assessed its functionality kinetics by ATP-induced DAPI incorporation (Figure 1E, as in [31]). High doses of ATP (30-150 μM and 0.5 mM for lymphocytes and microglia, respectively) cause P2RX7-dependent pore formation, allowing DAPI uptake by P2RX7 expressing cells. Those tests were performed on splenocytes (lymphocytes) and brain/spinal cord cells (microglia) from day 3 to day 98 post-AAV injection (Figure 1D & 1E).

In the spleen, tissue-resident immune cells such as regulatory T cells (Tregs identified as CD45⁺CD4⁺CD25⁺), conventional CD4 cells (CD4conv identified as CD45⁺CD4⁺CD25⁻) and CD8 T cells (identified as CD45⁺CD8⁺) were analyzed for cell surface bound Nbs. As expected, there was no Nb detection in the PBS group (Ctrl-, MFI histograms on the left, Figure 1F) in all cell types analyzed. As a positive control, we added a high dose (1µg) of recombinant 13A7-Fc Nbs to the cells, and obtained a complete saturation of P2RX7 at the surface of Tregs (which highly express the receptor) (Ctrl+, MFI histograms on the right, Figure 1F). In the AAV group, the results revealed a robust binding of the Nbs as soon as day 3 in Tregs and CD4conv. At this time point, we could still increase the P2RX7 occupancy with a saturating dose of the recombinant Nbs (Figure 1F). However, later on (from day 7 to day 98), we observed a loss of Nb detection. Interestingly, a high dose of recombinant Nbs in Tregs and CD4conv was not able to increase P2RX7 staining, suggesting a loss of the receptor. In all conditions, the Nbs were not detected at the surface of T CD8 cells (which was expected given the light P2RX7 expression in those cells). Moreover, we assessed the antagonist activity of the Nbs in the spleen through two sensitive assays (as in [31]): ATP-induced DAPI uptake and shedding of CD62L and CD27 (which only occurs on lymphocytes). In comparison with the PBS group, we observed a reduced DAPI incorporation and CD62L/CD27 shedding on Tregs on day 3 post-AAV injection, mainly when exposed to the 30 µM ATP dose in AAV1-13A7-Fc injected mice (Figure 1G). This finding nicely correlates with the data from the binding assays. Interestingly, regardless the concentration of ATP used, the effect was almost equivalent to the negative control (PBS group in the absence of ATP) from day 7 and lasting until the end of the experiment (on day 98) (Figure 1G). We found similar results with CD4conv

and T CD8 cells (although less significant), particularly at a concentration of 150 μ M ATP (Figure 1G).

In the brain and spinal cord, microglia was identified as CD45^{int}CD11b^{hi}. In the AAV group, we started to detect very substantial P2RX7 occupancy of the 13A7-Fc Nbs on brain microglial cells on day 7 post-AAV1-13A7-Fc injection, only 4 days later than the one found in the spleen (Figure 1H). This finding is remarkable and unexpected given that the blood brain barrier (BBB) generally shows a very low permeability for proteins including therapeutic antibodies to reach their targets on inflammatory cells in the CNS (47). However, we failed to observe significant microglial cell surface bound Nbs between day 14 and day 98, with progressive inability to stimulate the binding to P2RX7 with saturated dose of the Nbs (Figure 1H). In parallel, the functionality assay showed a specific blockade of ATP-induced P2RX7-dependent pore formation by the Nbs in the AAV group, illustrated by a faint but visible reduction of DAPI incorporation on day 3 post-AAV injection (Figure 1I). The effect gradually increased over time reaching a maximum on day 28 and lasting until day 98 post-AAV injection (Figure 1I).

As a tentative to explain the loss of P2RX7 detection even with a high dose of recombinant Nbs in the AAV group, we hypothesized that long-term production of 13A7-Fc Nbs with our AAVnano methodology may lead to a drastic reduction of the receptors at the cellular surface, potentially through their own internalization. To this end, whole protein lysates from splenic and CNS cells were analyzed for the presence of P2RX7 by Western Blot. In comparison with the negative (Ctrl- corresponds to HEK cells) and positive (Ctrl+ corresponds to P2RX7 expressing HEK cells) controls, as expected, we observed the presence of the receptors in both cell types from the PBS group (Figure 1J). Concerning splenic lysates from the AAV group, P2RX7 was already

moderately visible on day 3 post-injection with progressive loss until day 98 where no protein band was detected anymore. Likewise, a complete internalization of P2RX7 occurred on day 28 in CNS lysates from the AAV group (Figure 1J).

Altogether, our data confirm previous studies detailing precise *in vivo* pharmacodynamics of 13A7-Fc Nbs using the AAVnano technology. We demonstrated for the first time their striking capacity to reach through the BBB and specifically block P2RX7 expressing immune cells (*i.e.* microglia) in the CNS as soon as day 7 post-AAV injection: only a 4-day delay in comparison with splenic cells. Furthermore, we discovered that the P2RX7 inhibition can also be triggered by its own internalization, occurring from day 7 and day 14 post-AAV in the spleen and CNS tissues, respectively. This remarkable feature is achieved with a single i.m. injection of the AAV-nano vectors (*i.e.* AAV1-13A7-Fc) and persisted until day 98. The results clearly support that AAV-nano vectors represent an efficient and safe method to elicit endogenous long-term production of Nbs and long-term *in vivo* modulation of P2RX7 cell targets within peripheral as well as CNS tissues.

Intracranial injection of AAV1-13A7-Fc led to a continuous *in vivo* production of 13A7-Fc Nbs which specifically target P2RX7-expressing cells and to a long-term blockade of P2RX7 activity within both peripheral and CNS tissues.

In order to compare with other types of administration, we chose to supply AAV1-13A7-Fc vectors by intracranial (i.c.) stereotaxic injections, which is considered to be the most direct and efficient way to target the adult mouse brain. Hence, bypassing the physical and natural frontier imposed by the BBB, the i.c. injection can provide local expression (*i.e.* by the transduction of astrocytes) of the P2X7-blocking Nbs within the brain parenchyma.

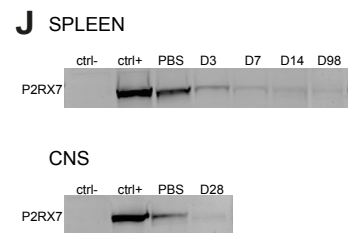
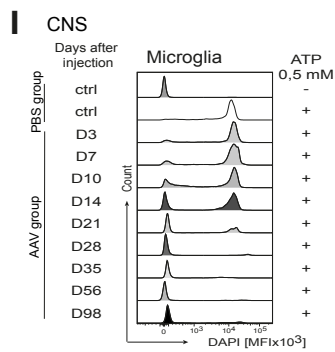
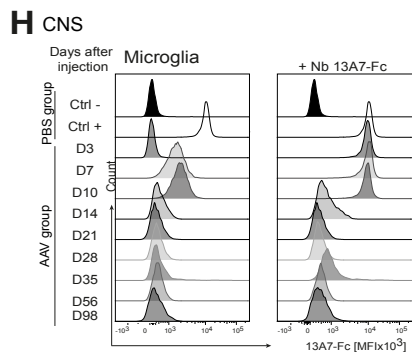
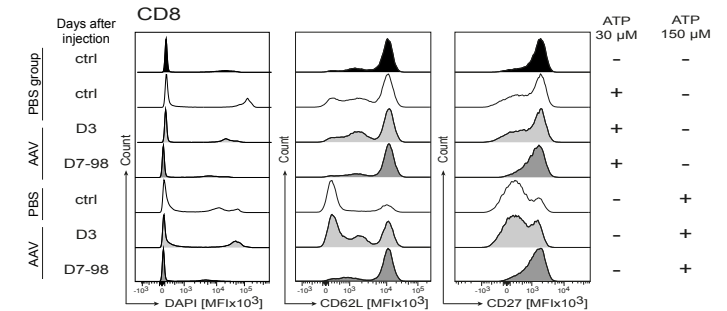
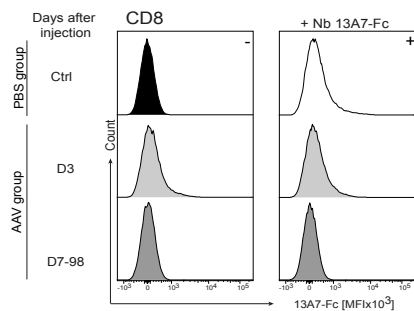
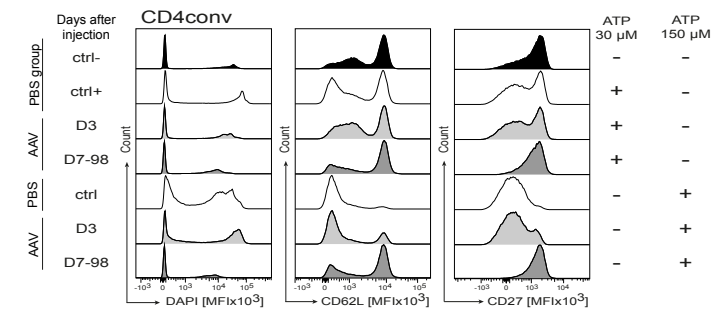
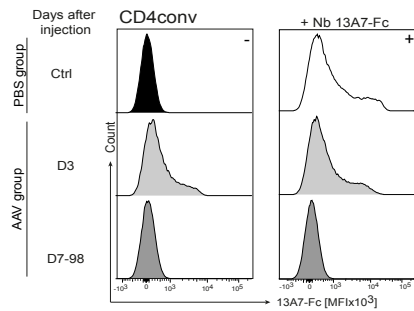
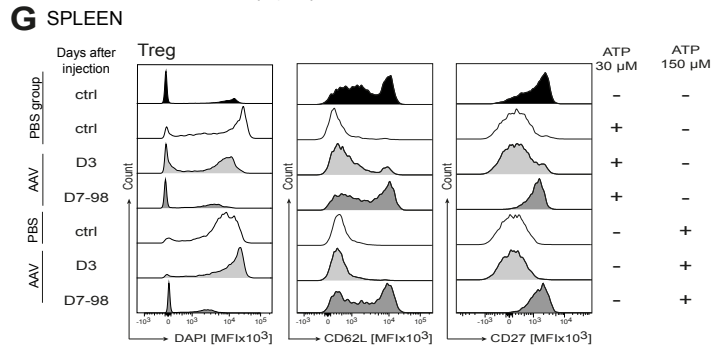
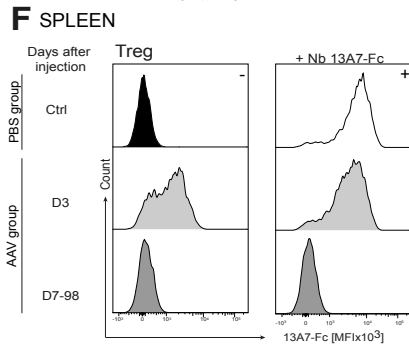
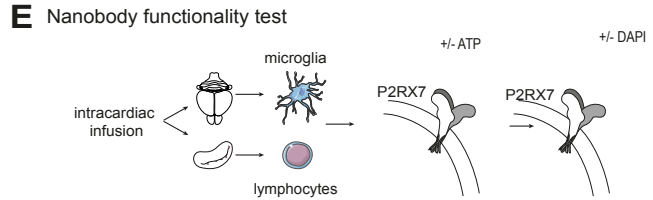
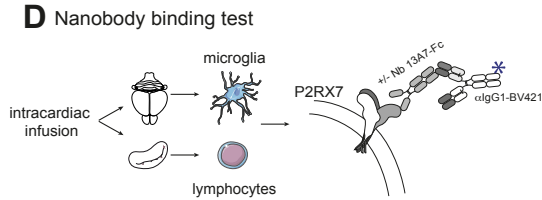
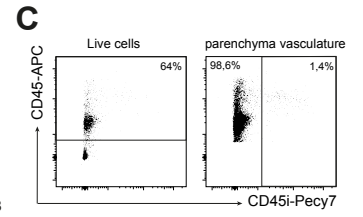
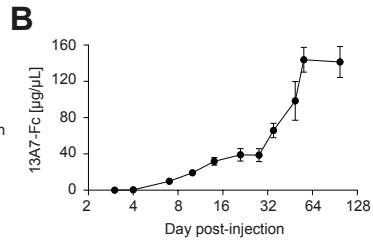
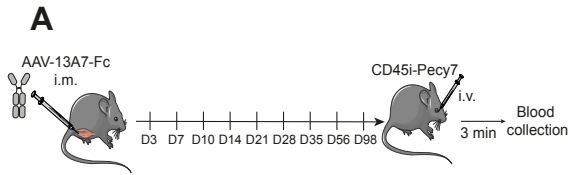


Figure 1. P2RX7 binding and inhibition by anti-P2RX7 bivalent nanobody *in vivo* after intramuscular injection of AAV-13A7-Fc vectors. The bivalent nanobody (Nb) named “13A7-Fc” includes two single antigen-binding domains from heavy chain antibodies. Those domains are fused with the Fc region of a conventional mouse Ab (*i.e.* IgG1) (with a total size of 90 kDa). The 13A7-Fc Nbs are P2RX7 specific antagonist nanobodies and are encoded by adeno-associated viral vector 1 (AAV1) vectors, named “AAV1-13A7-Fc”. **(A)** After intramuscular (*i.m.*, 10^{11} vg/mouse, 25 μ L/gastrocnemius muscle for a total of 100 μ L) injections to 7-week old female C57BL/6 mice (AAV group, n=4 mice/time of sacrifice), mice were sacrificed at different time points (D3 to D98). In parallel, mice injected *i.m.* with PBS were used as controls (Ctrl, PBS group, n=4/time of sacrifice). **(B)** After blood collection at different time points, the sera were incubated with HEK-P2RX7 cells allowing the binding of circulating 13A7-Fc Nbs to HEK-P2RX7 cells. The Nbs were then detected by flow cytometry using an anti-IgG1-BV421 murin mAb (recognizing the Fc part of the nanobodies) and quantified to obtain a kinetic of Nb production in AAV mice. **(C)** Three minutes before sacrifice, an anti-CD45-PECy7 mAb was injected intravenously (*i.v.*) to stain vascular leucocytes. At the given time point (*i.e.* D3 to D98) and after intracardiac perfusion, CNS (including brain and spinal cord) tissues were collected and prepared for flow cytometry analysis with also the CD45-APC mAb to detect CNS parenchyma leukocytes. **(D-E)** After intracardiac perfusion at the given time point (*i.e.* D3 to D98), the spleen and CNS (brain and spinal cord) tissues were harvested. The binding and functionality kinetics of 13A7-Fc nanobody were then monitored by flow cytometry by means of anti-13A7-Fc antibodies (*i.e.* anti-IgG1-BV421 murin mAb) or ATP-induced DAPI incorporation and shedding of CD62L and CD27 (which only occurs on lymphocytes), respectively. **(F)** At the given time point (*i.e.* D3 to D98), the binding rates are shown by mean fluorescent intensity (MFI) histograms of nanobodies at the surface of splenic lymphocytes (regulatory T cells (Tregs), conventional T cells (CD4conv) and CD8 cells). Left MFI histograms correspond to the detection of bound Nbs produced *in vivo* by the mice. The ones on the right correspond to the maximum binding rate due to the addition of saturating recombinant 13A7-Fc Nbs (+ Nb 13A7-Fc at 1 μ g). **(G)** At the given time point (*i.e.* D3 to D98), the functionality rates in splenic cells are shown by MFI histograms displaying: (i) DAPI uptake due to high doses of ATP (30-150 μ M) causing P2RX7-dependent pore formation and (ii) CD62L and CD27 shedding in presence of 30 or 150 μ M ATP. **(H-I)** As previously, at the given time point (*i.e.* D3 to D98), the binding and functionality rates were shown by MFI histograms in microglia. The DAPI uptake was performed with the addition of 0,5 mM ATP. All histograms represent one representative mouse but the experiments were performed at least three times with 2 mice/group/time of sacrifice. **(J)** Whole protein lysates from splenic and CNS cells were analyzed for the presence of P2RX7 by Western Blot. The negative control (Ctrl-) corresponds to HEK cells. The positive control (Ctrl+) corresponds to P2RX7 expressing HEK cells.

In this study, we used two i.c. methodologies: intracerebroventricular (i.c.v.) and intracisternal magna (i.c.m.) injections. 7-week old female C57BL/6 mice received i.c. either AAV1-13A7-Fc vectors (AAV group, n=2 mice/time of sacrifice, 10^{11} vg/mouse, in a total volume of 4 μ L (for i.c.v.) or 20 μ L (for i.c.m.)) or PBS (as control animals, PBS group, n=2/ time of sacrifice, using equivalent volume) (Figure 2A). As previously, mice were sacrificed at different time points from day 7 to day 98 in order to analyze P2RX7 occupancy and blockade by 13A7-Fc Nbs on harvested splenic lymphocytes and microglial cells by flow cytometry (Figure 2A). Before sacrifice, we injected i.v. CD45-PECy7 mAb allowing the exclusion of vascular leukocytes in our subsequent assays.

In the spleen, no detection of the Nbs was observed in the PBS group (Ctrl-, MFI histograms on the left) in all cell types analyzed (Figure 2B). A positive control consisted in the addition of a saturating dose (1 μ g) of recombinant 13A7-Fc Nbs to achieve maximal binding of P2RX7 at the cell surface (Ctrl+, MFI histograms on the right, Figure 2B). In the AAV group, regardless the type of i.c. injection, we found a complete absence of P2RX7 binding by the 13A7-Fc Nbs in all cell types from day 7 to day 98 (Figure 2B). Similar to what seen with an i.m. injection, we could not elevate the occupancy rate with the addition of a recombinant 13A7-Fc Nbs overload from day 7 post-AAV, even in Tregs and CD4conv (Figure 2B). As previously, this result indicates an important diminution of P2RX7 at the cell surface, likely due to its own internalization (Figure 1J). In parallel, we carried out the functionality assays of the Nbs. In comparison with the PBS group, on day 7 post-AAV injection, we noticed a profound reduction of DAPI incorporation and CD62L/CD27 shedding in Tregs at a concentration of 30 μ M ATP (Figure 2C). The inhibition of P2RX7 peaked on day 14 and day 21 for the i.c.v. and i.c.m. injections, respectively, and lingered until the end of the kinetic (*i.e.* day 98 post-AAV) (Figure 2C). At a higher ATP concentration (*i.e.*

150 μM), the P2RX7 blockade followed roughly the same profile, besides a less prominent effect and a noticeable higher efficacy of the Nbs compared to when AAV1-Nb vectors were given i.c.m. (Figure 2C). Similar results were found with CD4conv cells. Regarding CD8 T cells, we observed: (i) at 30 μM ATP, a robust inhibitory action of 13A7-Fc Nbs from day 21 to day 98, only for the i.c.m. AAV delivery and (ii) at 150 μM ATP, the inhibition kinetic resembles the one observed in Treg cells for both i.c.v. and i.c.m. injections with a better effect when AAV were i.c.m. administered (Figure 2C).

In microglia, in the AAV group, the cell surface bound Nb analyses demonstrated comparable profiles for both i.c.v. and i.c.m. methodologies, without the possibility to achieve full P2RX7 occupancy in microglial cells from day 7 post-AAV1-Nb injections (Figure 2D). This data is again similar to the one in splenic cells. Next, the functionality assay showed specific blockade of ATP-induced P2RX7-dependent pore formation by the Nbs in the AAV group, illustrated by: (i) a drastic reduction of DAPI incorporation on day 7 post-AAV injection, which was maintained until day 98 after i.c.v. administration and (ii) a significant but milder P2RX7 inhibition on day 7, with a stronger effect over time (Figure 2E). Notably, with i.c. injections, we could never obtain full P2RX7 blockade on microglial cells.

Therefore, we found very similar data with both types of i.c. administrations, even if the i.c.m. injection seems to be more efficient. We were surprised to notice that both binding and functionality kinetics in the spleen were comparable with either i.c. or i.m. injections. As for the CNS tissues, despite a delay of 7 days, there was no difference. Even more striking, we could reach a 100% inhibition of P2RX7 from day 28 until day 98 with the i.m. delivery. Given the data that we have gathered so far, we

have decided to choose the latter as the optimal AAV delivery method for targeting P2RX7 in the brain and for subsequent experiments with the EAE mouse models.

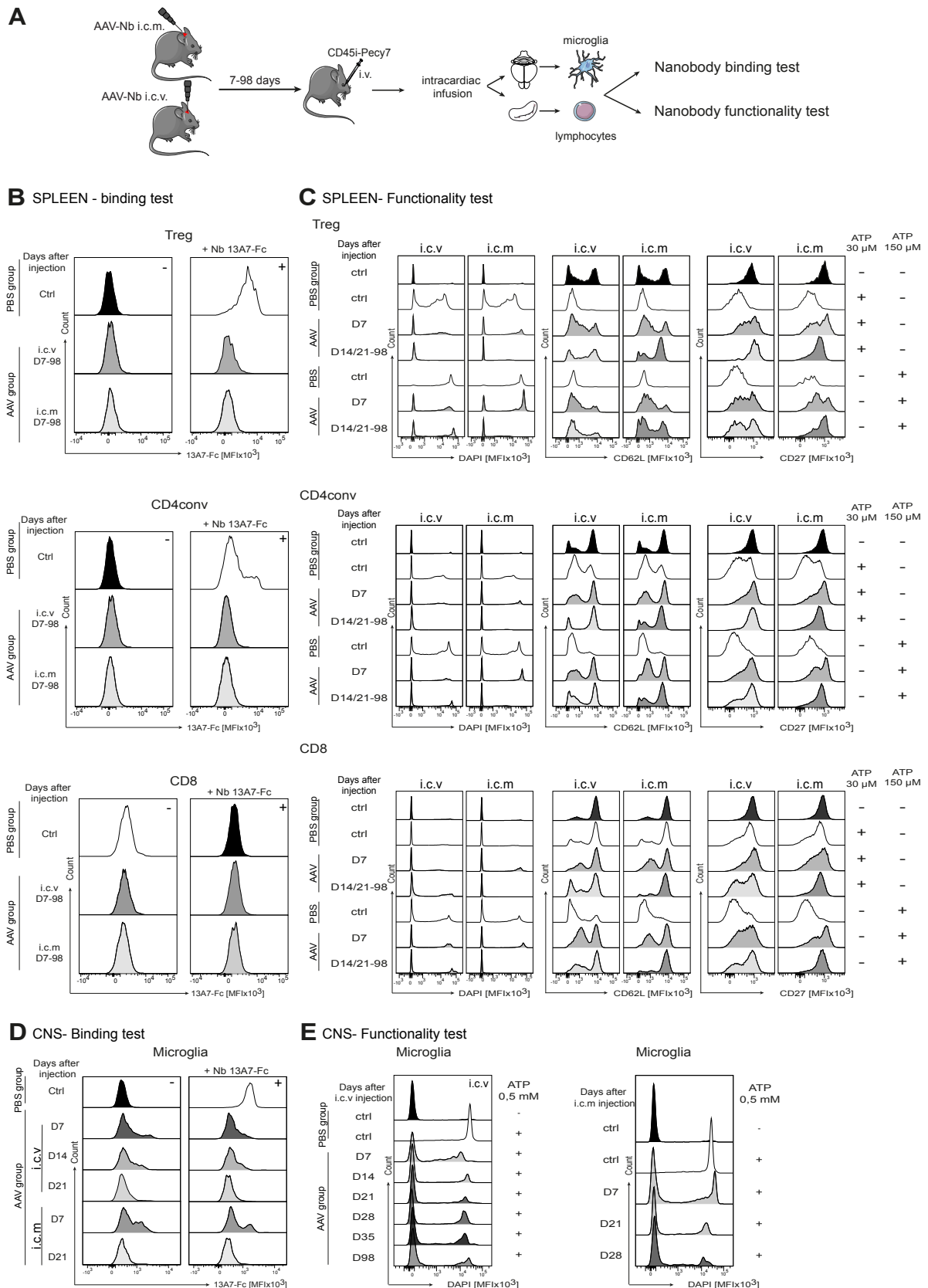


Figure 2. P2RX7 binding and inhibition by anti-P2RX7 bivalent nanobody *in vivo* after intracranial injection of AAV-13A7-Fc vectors. As in Figure 1, we used the AAV1-13A7-Fc vectors encoding the antagonistic 13A7-Fc Nbs. **(A)** After intracerebroventricular (i.c.v.) or intracisternal magna (i.c.m.) (*i.e.* 10^{11} vg/mouse, in a total volume of 4 μ L (for i.c.v.) or 20 μ L (for i.c.m.)) injections to 7-week old female C57BL/6 mice (AAV group, n=2 mice/time of sacrifice), mice were sacrificed at different time points (D7 to D98) to perform binding and functionality assays. In parallel, mice injected i.c. with PBS were used as controls (Ctrl, PBS group, n=2 mice/time of sacrifice, using equivalent total volume according to the type of injection). **(B-E)** After intracardiac perfusion at the given time point (*i.e.* D7 to D98), the spleen and CNS (brain and spinal cord) tissues were harvested. The binding and functionality kinetics of 13A7-Fc nanobody were then monitored as in Figure 1 by flow cytometry by means of anti-13A7-Fc antibodies (*i.e.* anti-IgG1-BV421 murin mAb) or ATP-induced DAPI incorporation and shedding of CD62L and CD27 (the latter only occurs on lymphocytes), respectively. **(B)** The binding rates are shown by MFI histograms in spleen on Tregs, CD4conv and CD8 cells. Left histograms correspond to the detection of bound Nbs produced *in vivo* by the mice. The right ones correspond to the maximum binding rate with saturating 13A7-Fc Nbs (+ Nb 13A7-Fc). **(C)** The functionality rates are shown by MFI histograms displaying: (i) DAPI uptake and (ii) CD62L and CD27 shedding in presence of 30 or 150 μ M ATP. **(D-E)** The binding and functionality rates were shown by MFI histograms in microglia. The DAPI uptake was performed with the addition of 0,5 mM ATP. All histograms represent one representative mouse but the experiments were performed at least three times with 2 mice/time of sacrifice.

AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to unexpected exacerbated chronic EAE and enhanced histopathological features.

We used AAV1-mediated production of P2RX7-blocking Nbs to investigate the importance and the therapeutic potential of P2RX7 in the pathophysiology of CNS autoimmunity. We chose the myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG₃₅₋₅₅)-induced chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model which mimics the most severe form of MS *i.e.* progressive MS. Indeed, as above, we administered i.m. either AAV1-13A7-Fc vectors coding for the antagonistic 13A7-Fc Nbs (AAV group, n=22) or PBS (PBS group as controls, n=22) to 7-week old female C57BL/6 mice. Three weeks later, a time point corresponding to substantial, even if

not complete, P2RX7 inhibition by the Nbs on brain microglia (Figure 1I), we induced chronic EAE in PBS and AAV groups by subcutaneous (s.c.) injections of 130 µg of MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA adjuvant (Figure 3A). In addition, mice received intraperitoneally (i.p.) 375 ng of pertussis toxin (PT) on the day of immunization and 2 days thereafter (Figure 3A). They were then daily monitored for EAE symptoms during at least 28 days. There was no significant difference in the incidence between the two groups, highlighting equal efficacy of the immunization (Figure 3B). However, regarding the course of the disease, AAV1-13A7-Fc-treated mice exhibited an unexpected exacerbation of the EAE clinical features in comparison with the PBS group (Figure 3C & 3D). In parallel, we observed heightened body weight loss between AAV- vs. PBS-treated EAE mice along the study (Figure 3E). Based on these data, we determined two time points of sacrifice for further analyses: day 40 post-AAV injection as the EAE peak and day 50 as the established chronic phase of the disease (Figure 3A).

Next, we quantified the CNS histopathological score. To this end, spinal cord sections of the PBS and AAV groups (n=8/group) from naïve and EAE mice (*i.e.* on days 40 (EAE peak) and 50 (EAE chronic phase) post-AAV injection) were stained with hematoxylin/eosin (for immune cell infiltration) and luxol fast blue (for myelin). The worsening clinical effect of 13A7-Fc Nbs was associated to a significant increase of the histopathological score on day 40 post-AAV injection *i.e.* at the EAE peak (Figure 3F & 3G). Indeed, spinal cord sections from AAV (vs. PBS)-treated mice, exhibited significantly enhanced immune cell infiltration and myelin loss within the CNS (Figure 3F & 3G). In contrast, no significant difference was noted during the chronic phase of EAE, on day 50 post-AAV injection (Figure 3F & 3G). This histopathological

observation actually correlates with the absence of differences in the clinical EAE score at the end of the experiment (Figure 3C).

Given the established activities of P2RX7 as a key mediator of inflammation, we expected here that 13A7-Fc blocking Nb would ameliorate the severity of the EAE disease. However, we reported complete opposite phenotype *i.e.* an aggravation of the symptoms and of CNS histopathological score. In order to further decipher the mechanisms involved, we performed subsequent studies.

AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to an increase in Th17 and Th17.1 cells in CNS during EAE pathogenesis.

In order to examine the inflammatory events occurring in the CNS during the course of EAE, we realized by flow cytometry (*i.e.* cell percentage and absolute number) a detailed phenotyping of tissue-resident immune cells such as microglial cells (identified as CD45^{int}CD11b^{hi}) and peripheral immune cells such as regulatory T cells (Tregs identified as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁺), conventional T CD4 cells (CD4^{conv} identified as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻) and CD8 T cells (identified as CD45⁺CD8⁺). We prepared brain cell suspensions of PBS and AAV groups from naive (n=4/group) and EAE (n=8/time of sacrifice *i.e.* on days 40 (EAE peak) and 50 (EAE chronic phase) post-AAV injection) mice (Figure 3A). No major differences were found in microglial cell proportion and absolute cell numbers (Figure 4A). Concerning the T cell subpopulations, we could observe a major increase of CD4^{conv} percentages and cell numbers at the EAE peak and chronic phase in comparison with the PBS group, but not of Tregs or CD8⁺ cells (Figure 4A).

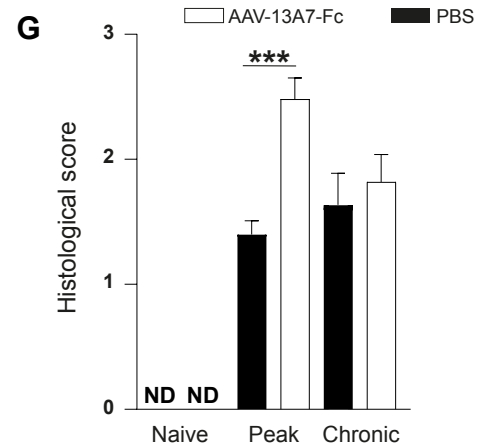
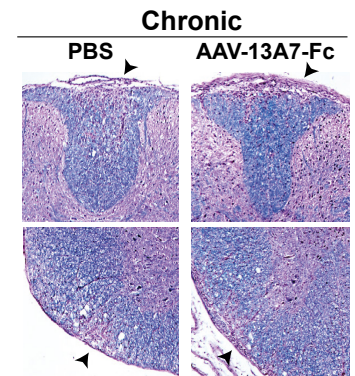
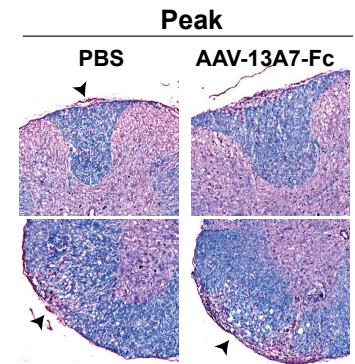
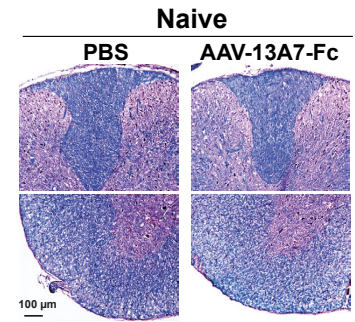
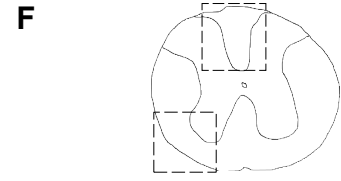
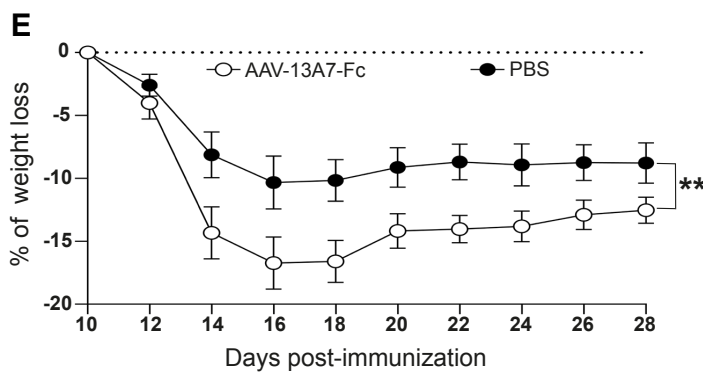
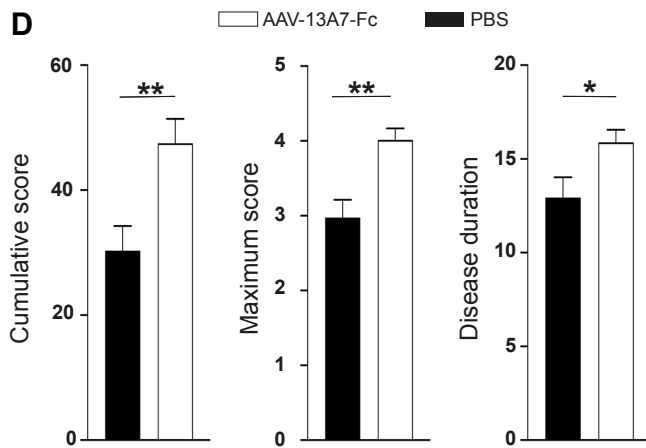
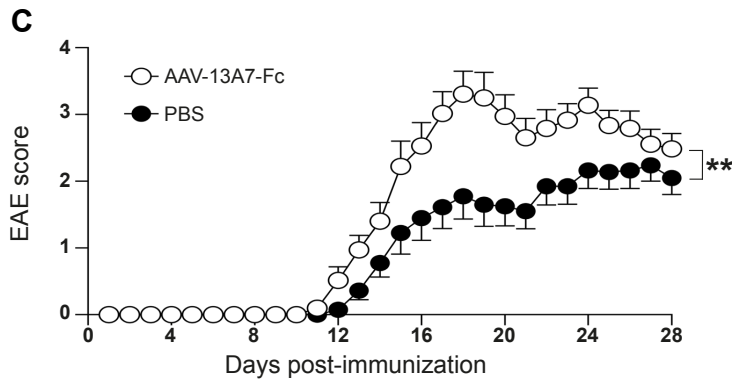
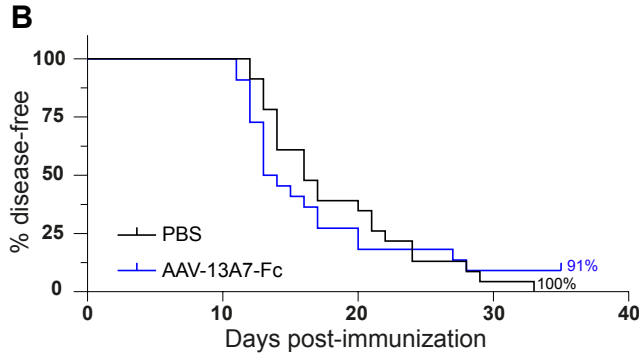
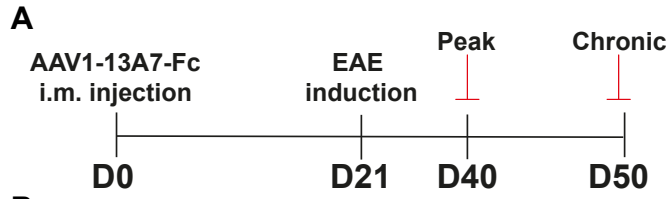
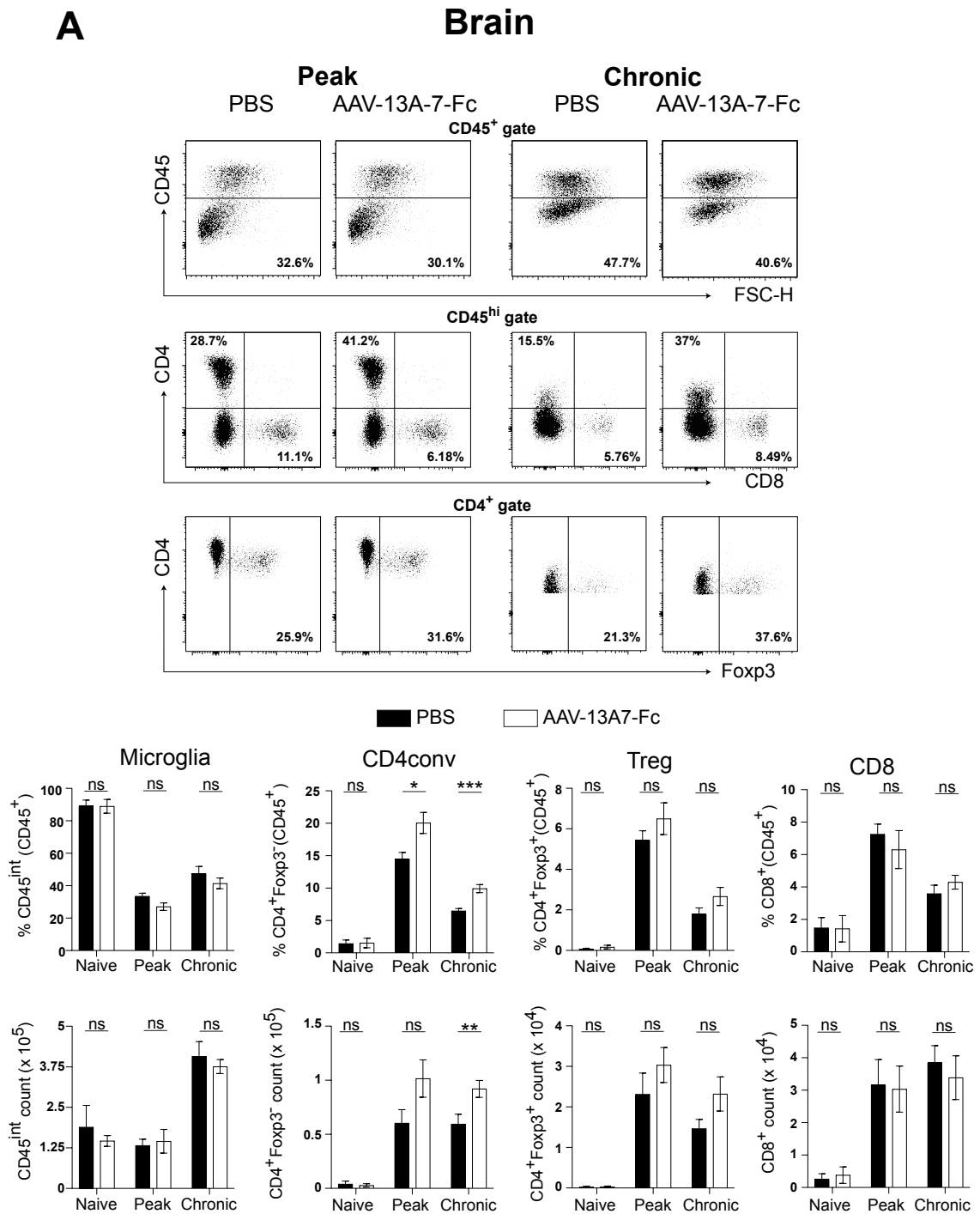


Figure 3. AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to unexpected exacerbated chronic EAE and enhanced histopathological scores. **(A)** 7-week old female C57BL/6 mice were i.m. injected with either PBS (PBS group, n=22) or with AAV1-13A7-Fc (AAV group, n=22). Three weeks, chronic EAE was induced with subcutaneous (s.c.) injections of 130 µg of MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA adjuvant. In addition, mice also received intraperitoneally (i.p.) 375 ng of pertussis toxin (PT) on the day of immunization and 2 days thereafter. Then, mice were daily scored and sacrificed on day 40 post-AAV injection as the EAE peak and day 50 as the established chronic phase of the disease. **(B)** The graph shows the EAE incidence as the percentage of asymptomatic mice. **(C)** The graph shows clinical curves as daily mean EAE clinical scores (\pm SEM). **(D)** Graphs show mean: EAE cumulative score, EAE maximum score and disease duration (\pm SEM). **(E)** The graph shows the percentage of weight loss (in comparison with weight before EAE symptoms) during the disease development. **(F)** On day 40 (EAE peak) and 50 (EAE chronic phase) post-AAV injection, spinal cord tissues of PBS and AAV groups (n=8/ group) from naïve and EAE mice were collected and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. Six-micrometer sections from OCT-embedded tissues were stained with hematoxylin/eosin (to distinguish cell infiltration) and luxol fast blue (to detect myelin). Sections were photographed at x10 (Zeiss Axioscope). Two representative areas are shown. Arrows point at inflammatory and demyelinating foci. **(G)** The graph shows average histopathological scores (\pm SEM). The histopathological score goes from 0 (no infiltration and no demyelination) to 4 (severe infiltration and demyelination). ND = not detectable, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns = not significant (2way-anova or Mann-Whitney tests).

Next, we investigated whether or not the AAV1-13A7-Fc treatment modulated the T cell activation status. Hence, subsequent analyses were focused on memory conventional T CD4 lymphocytes (CD4M defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺). Among them, we analyzed the proportions and cell numbers of Th1 (defined as CD4MTbet⁺ROR γ t⁻), Th17 (defined as CD4MTbet⁻ROR γ t⁺) and Th17.1 (defined as CD4MTbet⁺ROR γ t⁺) subsets. Except for the Th1 subpopulation (*i.e.* diminished percentage at the EAE chronic phase), there was: (i) enhanced absolute cell numbers for Th17 for both time of sacrifice and (ii) higher percentages and cell numbers of the Th17.1 subset at the peak of EAE in EAE-induced AAV versus PBS mice (Figure 4B).

This finding suggests that AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation strongly upregulates the activities of both Th17 and Th17.1, two pathogenic subsets known to play key actions in the EAE development.



B

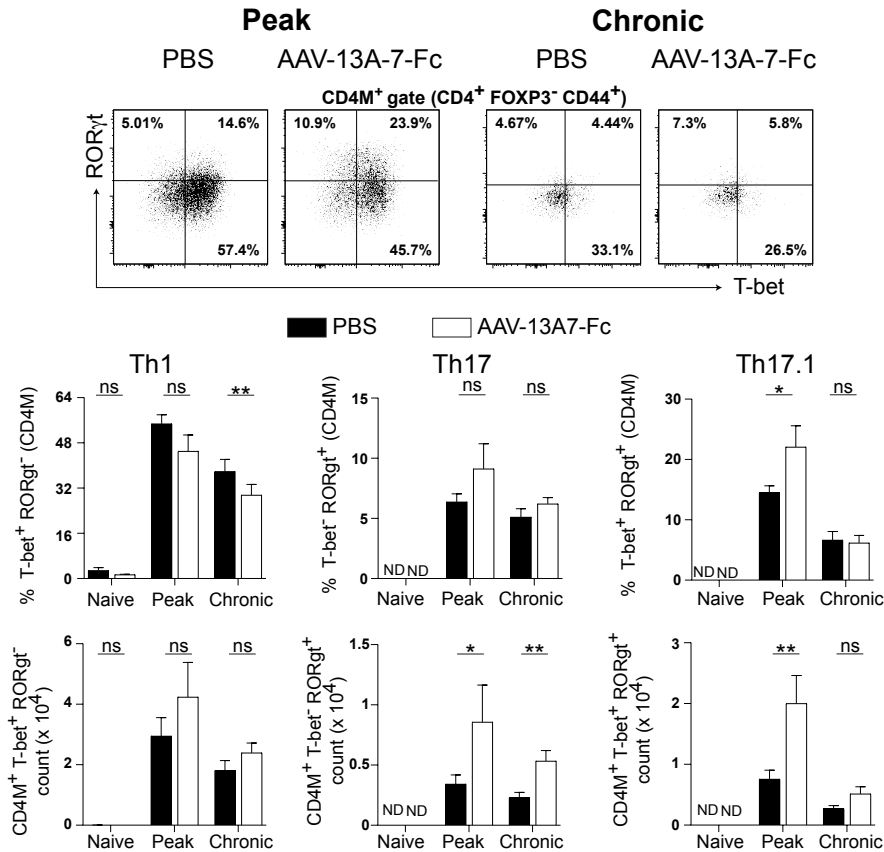


Figure 4. AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to an increase in Th17 and Th17.1 cells in CNS during EAE pathogenesis. Brain cell suspensions of PBS and AAV groups were prepared from naive (n=4/group) and EAE (n=8/time of sacrifice *i.e.* on days 40 (EAE peak) and 50 (EAE chronic phase) post-AAV injection) mice, and were analyzed by flow cytometry in term of cell percentage and absolute number. **(A)** Cells were stained with anti-CD45, anti-CD4, anti-CD8, and anti-Foxp3 antibodies. Representative FACS plots show the percentage of microglial cells (identified as CD45^{int}CD11b^{hi}) and peripheral immune cells such as regulatory T (Tregs defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁺), conventional T CD4 (CD4^{conv} defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻) and T CD8 (defined as CD45⁺CD8⁺) subsets. Graphs show the mean percentage of each subpopulation among CD45⁺ or total cell number. **(B)** Cells were stained with anti-CD45, anti-CD4, anti-CD44, anti-Tbet, and anti-RORγt antibodies. Representative FACS plots show the percentage of Th1 (defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺Tbet⁺RORγt⁻), Th17 (defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺Tbet⁻RORγt⁺) and Th17.1 (defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺Tbet⁺RORγt⁺) subsets. Graphs show the mean percentage of each subpopulation among memory T CD4 lymphocytes (CD4M defined as CD45⁺CD4⁺Foxp3⁻CD44⁺). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns = not significant, ND = not detectable (Multiple Mann-Whitney test, between PBS and AAV group).

AAV1-13A7-Fc treatment before EAE induction led to enhanced astrocyte, microglial, and demyelinating activities in naïve and EAE AAV-treated mice.

Demyelination is a hallmark of MS and EAE, and is strongly linked to the symptoms of the disease. By immunofluorescence staining of myelin basic protein (MBP) using spinal cord sections of the PBS and AAV groups from naïve (n=4/group) and EAE (n=8/group, *i.e.* on days 40 (EAE peak) and 50 (EAE chronic phase) post-AAV injection) mice, we found that the percentage of MBP stained area in the white matter was significantly diminished in EAE vs. naïve mice, and that treatment of mice undergoing EAE with AAV1-13A7-Fc significantly heightened myelin loss at both time of sacrifice (Figure 5A).

In addition to the immune component of EAE pathogenesis, activated glial cells contribute to neurodegenerative processes. Previous studies have shown that P2RX7 modulates microglial functionality *in vitro* [31]. We used the marker Iba1 in order to study myeloid (*i.e.* macrophages and microglia) responses in EAE. Strikingly, in naïve mice, the percentage of Iba1⁺ stained area was dramatically enhanced in the spinal cord parenchyma from AAV versus PBS groups (Figure 5B). Interestingly, this difference was maintained at the peak of EAE (on day 40 post-AAV injection) with a robust increase in the area of Iba1⁺ staining (Figure 5B). Moreover, astrocyte activation in the spinal cord occurred in response to EAE, as such we used the GFAP marker that has been ascribed to activated astrocytes. In naïve mice, we already noticed a more abundant GFAP⁺ staining in AAV1-13A7-Fc-treated vs. PBS-treated mice (Figure 5C). In EAE mice, we observed an increase of percentage of stained GFAP⁺ area, however the AAV group still exhibits stronger staining (Figure 5C).

The ultimate consequence nurturing irreversible neurodegenerative events during MS and EAE pathogenesis is neuronal death/apoptosis. To this end, we chose

the NeuN marker to determine the number of the neurons and their tissue distribution by immunofluorescence staining. We found no significant differences in the NeuN⁺ cell number in naïve AAV group vs. naïve PBS group at all times analyzed (Figure 5D).

In correlation with previous clinical and histopathological features, these results suggest that P2RX7 blocking Nbs may foster events that are key in neurodegenerative processes and may thus contribute: (i) to the exacerbated demyelination in EAE-induced AAV vs. PBS mice and (ii) to reactive microgliosis through drastic increased microglial activation and/or monocyte/macrophage infiltration and to astrogliosis through substantial elevated number of activated astrocytes in naïve context as well as during the acute phase of the disease.

AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to robust increase of MOG-specific Th1 and Th17 responses in draining lymph node cultures upon *ex vivo* antigen rechallenge.

Priming of T cells against MOG₃₅₋₅₅ in the draining lymph nodes (DLNs) is critical for EAE development. The data above showed that AAV1-13A7-Fc treatments dramatically alter (*i.e.* strong increase) the proportions and cell numbers of both pathogenic Th17 and Th17.1 cell populations in the CNS. However, it does not reveal whether or not it modulates their responsiveness to MOG₃₅₋₅₅ (*i.e.* Th1 and Th17 responses).

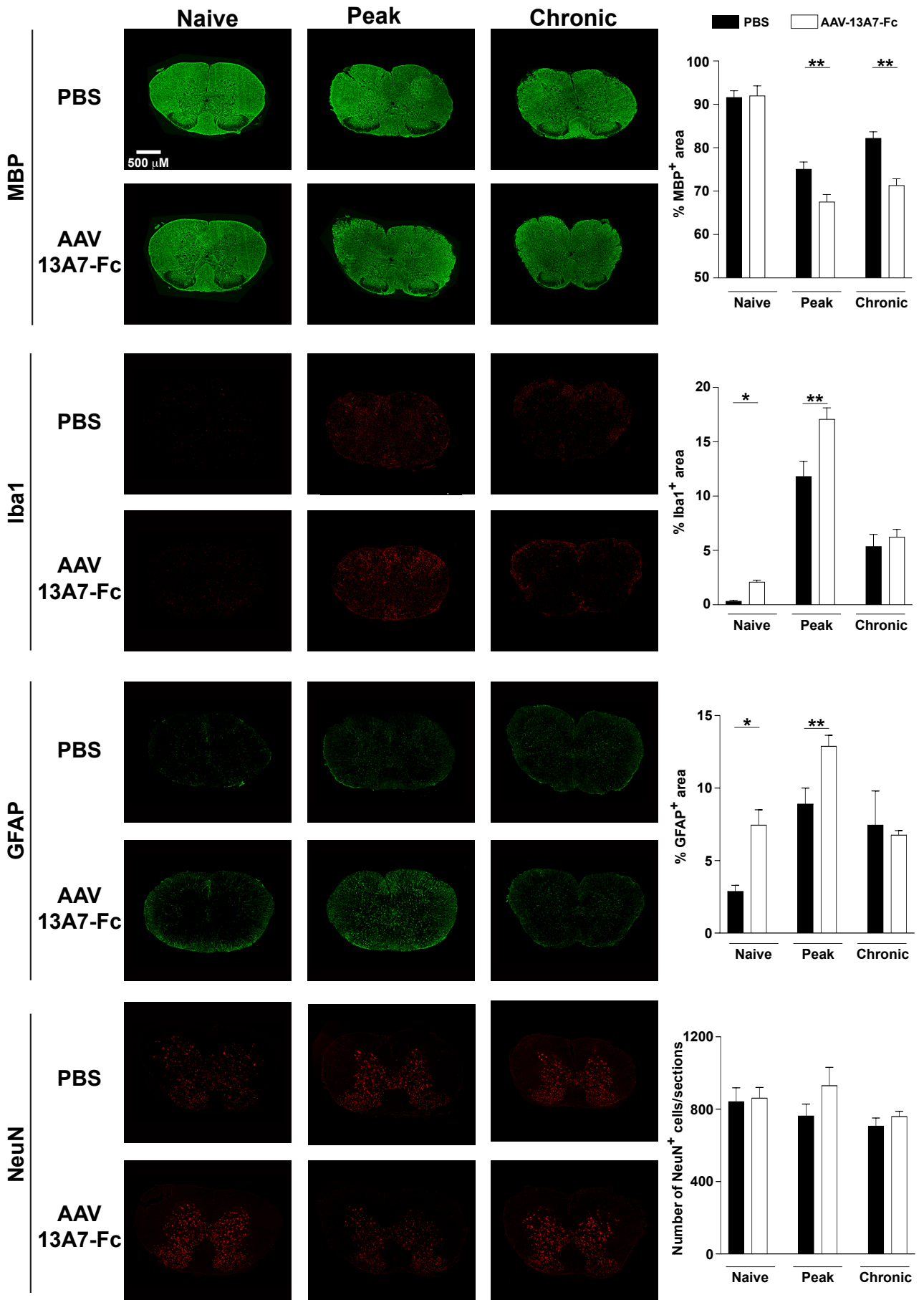


Figure 5. AAV1-13A7-Fc treatment before EAE induction led to enhanced astrocyte, microglial, and demyelinating activities in naïve and EAE AAV-treated mice. For immunofluorescence purpose, spinal cord of PBS and AAV groups from naïve (n=4/group) and EAE mice (n=8/group, *i.e.* on days 40 (EAE peak) and 50 (EAE chronic phase) post-AAV injection) were collected and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. Six-micrometer sections from OCT-embedded tissues were labeled overnight at 4°C with primary antibodies: (i) rat anti-myelin basic protein (MBP) or anti-GFAP and (ii) rabbit anti-NeuN or anti-Iba1. Then, sections were incubated with anti-rat Alexa-fluor 488 or anti-rabbit cy3 conjugated secondary fluorescent antibodies. Slides were mounted using Fluoromont-G with DAPI. All images were taken at magnification x10 with microscope Thunder Imager Tissue with LAS X navigator logiciel and activation of Thunder normal option. Images were analyzed by imageJ. Graphs show the percentage of MBP, Iba1 and GFAP areas and the number of NeuN⁺ cells per section of spinal cord. *p<0.05, **p<0.01 (Mann-Whitney test).

To address this question, we performed antigen-recall studies with DLN cells collected at the peak (on day 40 post-AAV) and the chronic phase (on day 50 post-AAV) of the disease, stimulated with MOG₃₅₋₅₅ or the irrelevant antigen ovalbumin *in vitro*. With ELISA quantification, cells from both PBS- and AAV1-13A7-Fc-treated mice (n=8/group/time of sacrifice) sacrificed at the EAE peak exhibited robust and equivalent IFN- γ (Th1 specific) cytokine production, but with significant raise of IL-17 (Th17 specific) concentration in response to MOG₃₅₋₅₅ (Figure 6A). Notably, we found a higher secretion of both T cell proinflammatory cytokines in stimulated AAV- vs. PBS-treated DLNs cultures (Figure 6B).

These results indicate that the detrimental actions of 13A7-Fc nanobody may rely, at least in part, on an hyperstimulation of peripheral encephalitogenic Th responses in EAE-induced AAV mice.

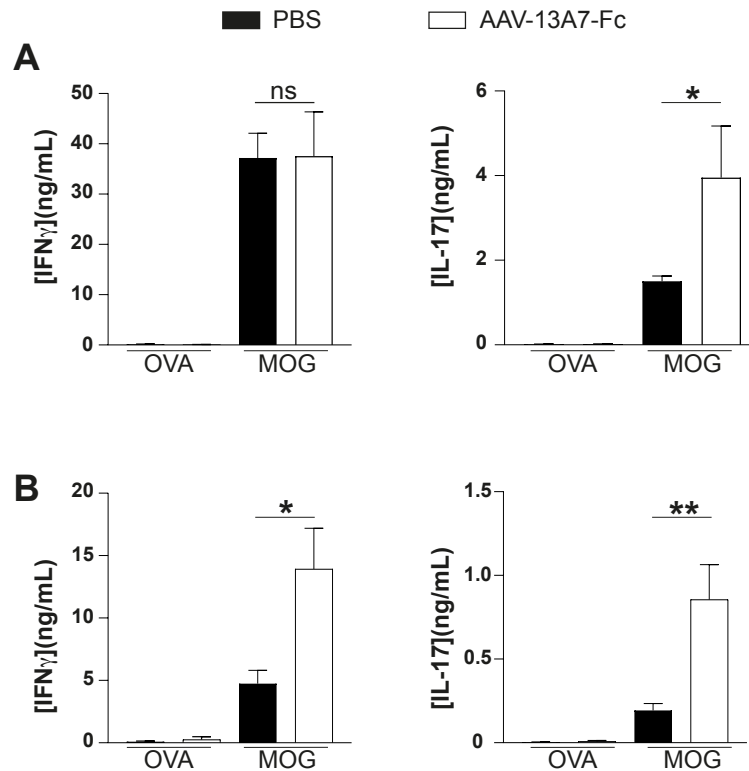


Figure 6. AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to robust increase of MOG-specific Th1 and Th17 responses in draining lymph node cultures upon ex vivo antigen rechallenge. To perform antigen-recall studies, draining lymph node (DLN) cells from PBS- and AAV1-13A7-Fc-treated mice were collected at the peak (**panel A**, on day 40 post-AAV) and the chronic phase (**panel B**, on day 50 post-AAV) of the disease (n=8/time of sacrifice), and stimulated with MOG₃₅₋₅₅ (at 20 μ g/mL) or the irrelevant antigen ovalbumin (OVA, 20 μ g/mL) *in vitro* for 72 hours. Th1 and Th17 proinflammatory cytokine secretion (*i.e.* IFN- γ and IL-17, respectively) into the culture supernatants were measured by ELISA. * p <0.05, ** p <0.01, ns = not significant (*Mann-Whitney test*).

AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to increased expression of key proinflammatory mediators in CNS tissues during EAE pathogenesis.

According to the previous data, the EAE induction of AAV1-13A7-Fc-treated mice triggers enhanced EAE features including CNS histopathological score, microgliosis and astrogliosis. To better define the underlying CNS inflammatory processes, the mRNA expression of key mediators and factors was determined by RT-qPCR in spinal cord tissues of naïve (n=4/group) and EAE (n=8/group/time of sacrifice, *i.e.* 40 days

(peak) and 50 days (chronic) after AAV injection) PBS- and AAV-treated mice. Although not significant, we found a generalized increase of mRNA levels of the chemokine MCP-1/CCL2, the chemokine receptor CCR5, and proinflammatory cytokines (TNF α and IL-6) in the spinal cords of EAE-induced AAV vs. PBS mice (Figure 7). Interesting, there was a greater expression of IFN- γ (Th1 specific) and IL-17 (Th17 specific), two hallmark proinflammatory cytokines of EAE, particularly on day 50 post-AAV (Figure 7). No difference was observed for anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF β). Regarding the P2RX7-mediated NLRP3 inflammasome pathway, the mRNA levels of IL-1 β was reduced at the peak of EAE (day 40) in the AAV group (Figure 7).

AAV1-13A7-Fc treatment after EAE induction led to striking amelioration of the clinical and histopathological features of ongoing chronic EAE.

The MOG₃₅₋₅₅-induced chronic EAE model requires two important phases to occur properly: (i) the immunization phase allowing the amplification of inflammatory responses, particularly driven by autoreactive Th1 and Th17 cells and (ii) the effector phase illustrating the migration or infiltration of peripheral encephalitogenic (*i.e.* activated and/or memory) immune cells towards the CNS. In our previous experiments using the AAVnano strategy, we injected the AAV1-13A7-Fc vectors three weeks before the induction of EAE, leading to mute all P2RX7 activities in both peripheral and CNS tissues. In this context, an exacerbated EAE development happened in AAV-treated mice, which resembled a previously observed phenotype in P2RX7 KO mice.

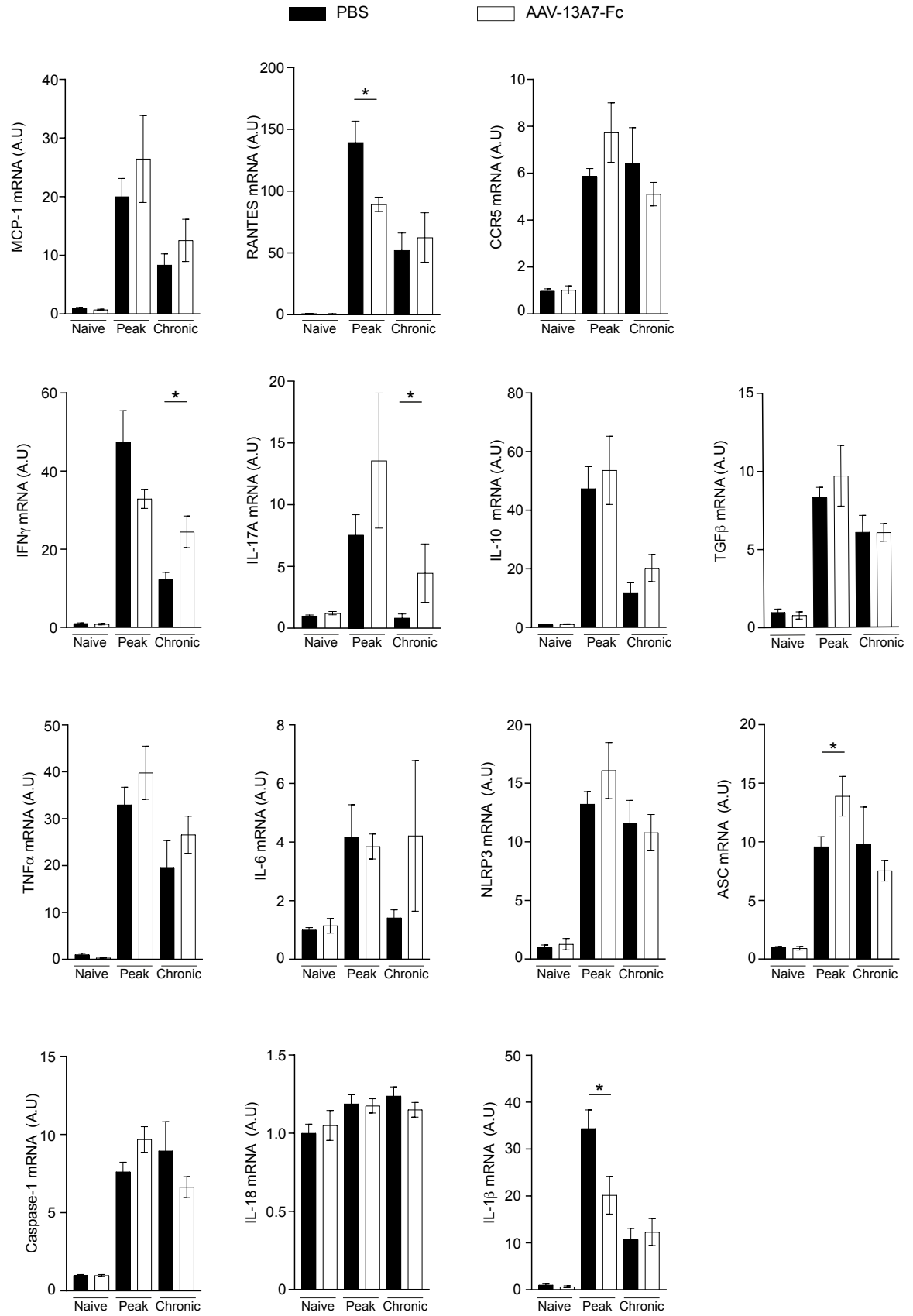


Figure 7. AAV1-13A7-Fc treatment before EAE manifestation led to increased expression of key proinflammatory mediators in CNS tissues during EAE pathogenesis.

The mRNA expression of key mediators was determined by RT-qPCR in spinal cord tissues of PBS and AAV groups from naïve (n=4/group) and EAE (n=8/group/time of sacrifice, *i.e.* 40 days (peak) and 50 days (chronic) after AAV injection) mice. The graphs show the relative mRNA expression level of chemokines (*i.e.* MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5), CCR5 chemokine receptor, pro-inflammatory (*i.e.* TNF α , IL-6, IFN γ , and IL-17A) and anti-inflammatory (*i.e.* TGF β and IL-10) cytokines, as well as factors involved in NLRP3 inflammasome pathway (*i.e.* NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β , and IL-18). * p <0,05 (Mann-Whitney test).

We next aimed to start AAVnano treatment at a later time point, on day 4 post-EAE induction. At this time point, we injected *i.m.* either AAV1-13A7-Fc vectors (AAV group, n=15) or PBS (PBS group as controls, n=15) to 8-week-old female C57BL/6 mice. Four days after chronic EAE induction is a time point that permitted to investigate the impact of P2RX7 blockade by the antagonist Nbs in EAE diseased mice, possibly during both ongoing (*i.e.* immunization and effector) phases (Figure 8A). No significant difference was observed in the incidence between the two groups highlighting equal efficacy of the immunization (Figure 8B). Interestingly, in comparison with the PBS group, the AAV1-13A7-Fc treatments efficiently ameliorated clinical EAE scores, as reflected by the reduction of the average cumulative score and disease duration (Figure 8C & 8D). Moreover, AAV1-13A7-Fc-treated mice displayed reduced percentages of body weight loss during the course of the disease (Figure 8E).

The two time points of sacrifice were: day 18 post-immunization as the EAE peak and day 31 as the EAE chronic phase (Figure 8A). The CNS histopathological score was then examined as previously using spinal cord sections of the PBS and AAV groups (n=8/group) from naïve and EAE mice. The beneficial clinical effect of 13A7-Fc Nbs was linked to a significantly decreased histopathological score at the EAE peak, as illustrated by significantly reduced immune cell infiltration and myelin loss (Figure

8F & 8G). In parallel, there was no significant difference during the chronic phase of EAE, on day 31 post-immunization (Figure 8F & 8G), possibly correlated to the clinical EAE scores at the time of sacrifice (Figure 8C).

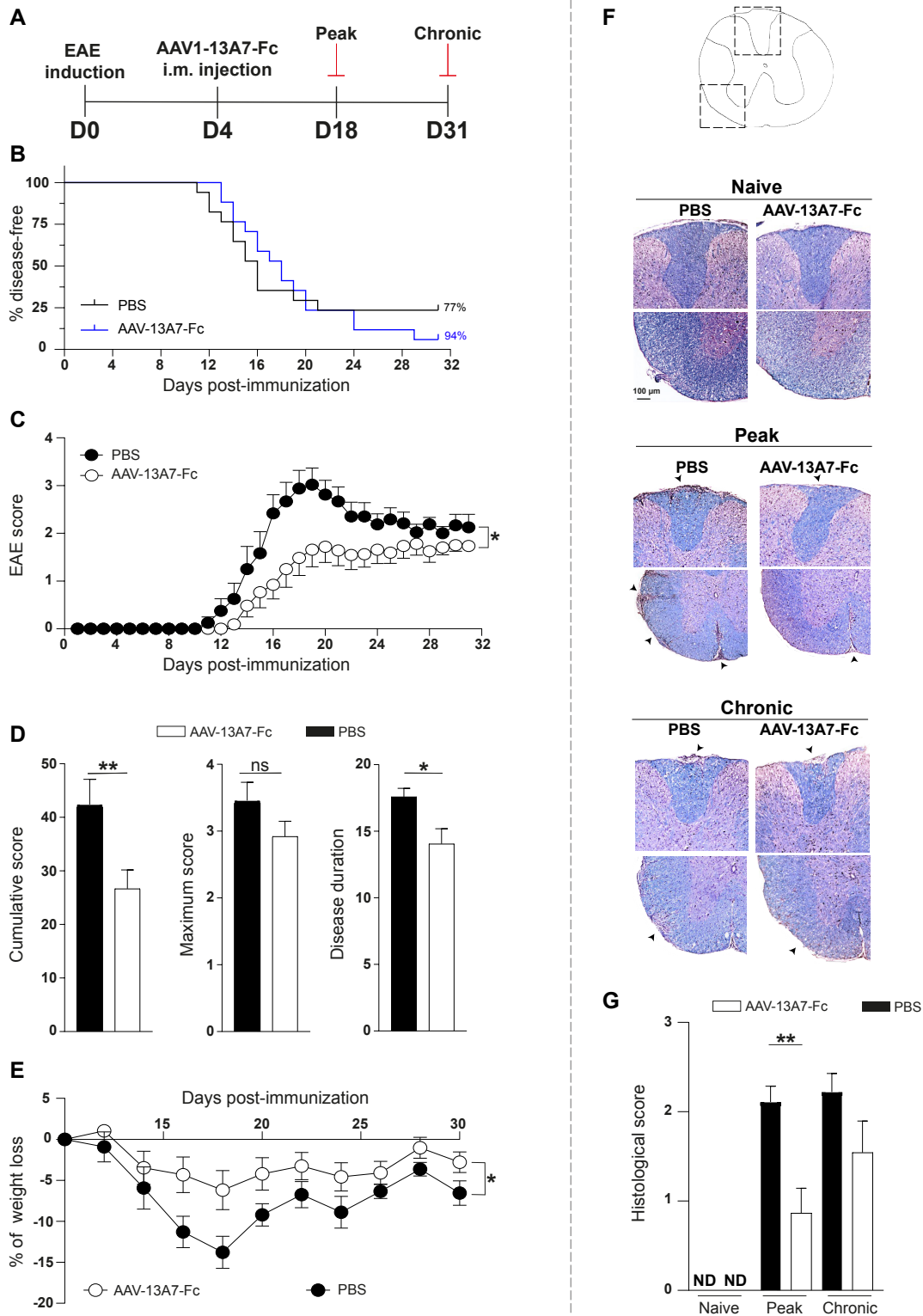


Figure 8. AAV1-13A7-Fc treatment after EAE induction led to striking amelioration of the clinical and histopathological features of ongoing chronic EAE. (A) Chronic EAE was induced in 8-week old female C57BL/6 mice with s.c. injections of 130 µg of MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA adjuvant. In addition, mice also received i.p. 375 ng of pertussis toxin on the day of immunization and 2 days thereafter. Four days later, they were i.m. injected with either PBS (PBS group, n=15) or with AAV1-13A7-Fc (AAV group, n=15, 10¹¹ vg/mice). Then, mice were daily scored and sacrificed on day 18 (EAE peak) and day 31 (chronic phase) post-immunization. (B) The graph shows the EAE incidence as the percentage of asymptomatic mice. (C) The graph shows clinical curves as daily mean EAE clinical scores (± SEM). (D) Graphs show mean: EAE cumulative score, EAE maximum score and disease duration (± SEM). (E) The graph shows the percentage of weight loss (in comparison with weight before EAE symptoms) during the disease development. (F) As in Figure 3, on day 18 (EAE peak) and 31 (EAE chronic phase) post-immunization, spinal cord tissues of PBS and AAV groups (n=8/ group) from naïve and EAE mice were stained with hematoxylin/eosin and luxol fast blue. Sections were photographed at x10 (Zeiss Axioscope). Two representative areas are shown. Arrows point at inflammatory and demyelinating foci. (G) The graph shows average histopathological scores (± SEM). ND = not detectable, *p<0.05, **p<0.01, ns = not significant (2way-anova or Mann-Whitney tests).

Therefore, we demonstrated that P2RX7 inhibition in diseased mice led to an improvement of the pathology and to a potential impairment of the T cell recruitment to the CNS, critical for the development of neuroinflammation during EAE. Corroborating the lower degree of inflammation in the CNS and altered peripheral Th responses in AAV1-13A7-Fc-treated mice, there was a significant generalized reduction of the expression of chemokines (MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5) and both proinflammatory (TNF-α and IFN-γ) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF-β), in the spinal cords of AAV- compared to PBS-treated mice (n=8/group/time of sacrifice), particularly on day 18 post-EAE induction (Figure 9). Remarkably, the expression of factors involved in the P2RX7-mediated NLRP3 inflammasome pathway such as NLRP3, ASC, and Caspase-1 was substantially diminished at the peak of EAE

(day 18) and remaining low at the chronic phase (day 31) in AAV-treated EAE mice (Figure 9).

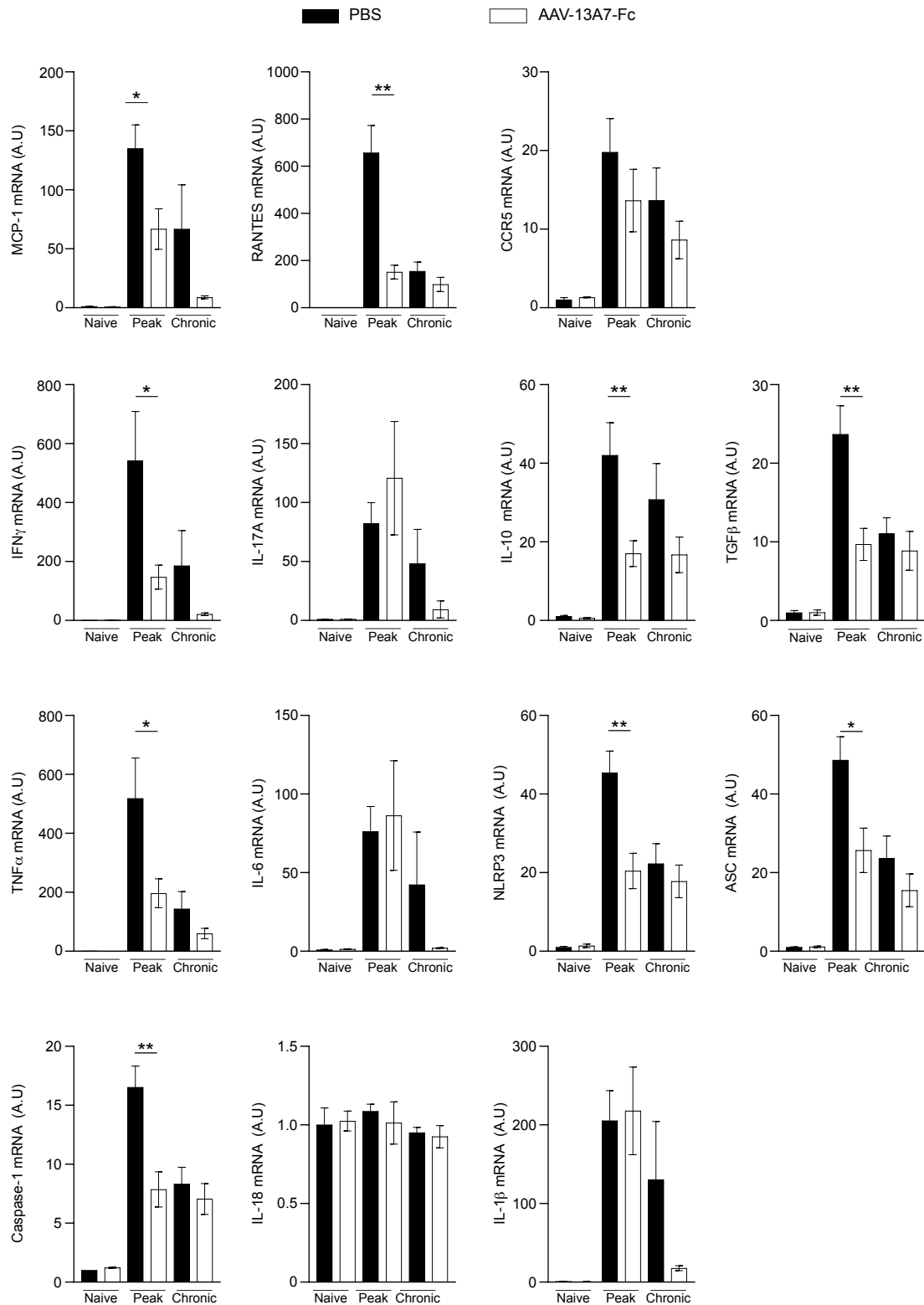


Figure 9. AAV1-13A7-Fc treatment after EAE induction led to reduced expression of key proinflammatory mediators in CNS tissues during EAE pathogenesis. The mRNA expression of key mediators was determined by RT-qPCR in spinal cord tissues of PBS and AAV groups from naïve (n=4/group) and EAE (n=8/group/time of sacrifice, *i.e.* 18 days (peak) and 31 days (chronic) after EAE injection) mice. The graphs show the relative mRNA expression level of chemokines (*i.e.* MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5), CCR5 chemokine receptor, pro-inflammatory (*i.e.* TNF α , IL-6, IFN γ , and IL-17A) and anti-inflammatory (*i.e.* TGF β and IL-10) cytokines, as well as factors involved in NLRP3 inflammasome pathway (*i.e.* NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β , and IL-18). * p <0,05 (Mann-Whitney test).

These results provide the proof-of-concept that P2RX7-antagonistic 13A7-Fc nanobody exhibits potent therapeutic actions during the occurrence of EAE, potentially acting on the initial acute episodes of inflammation and in the late progressive and neurodegenerative phase.

AAV1-13A7-Fc treatment after EAE induction led to drastic reduction of MOG-specific Th1 and Th17 responses in draining lymph node cultures upon *ex vivo* antigen rechallenge.

The data above suggest that AAV1-13A7-Fc treatment after EAE induction may play a key role during the initial acute episodes of EAE inflammation. To address it, as previously (n=8/group/time of sacrifice), we performed Th1 and Th17 cytokine production analyses in response to MOG₃₅₋₅₅ to evaluate their encephalitogenic properties. On day 18 post-immunization, we noticed a profound decline of both IFN- γ (Th1 specific) and IL-17 (Th17 specific) cytokine production in MOG₃₅₋₅₅-stimulated AAV vs. PBS DLNs cultures (Figure 10A).

However, the effect became no more significant during the chronic EAE phase (Figure 10B). In parallel, we performed antigen-recall studies with only DLN cells from

EAE-induced PBS mice (n=9) in the presence of MOG₃₅₋₅₅ or ovalbumin, but supplemented with saturated dose of recombinant 13A7-Fc nanobody. Interestingly, we could observe a similar reduction of IFN γ , and a trend to a reduction of IL-17 (Figure 10C).

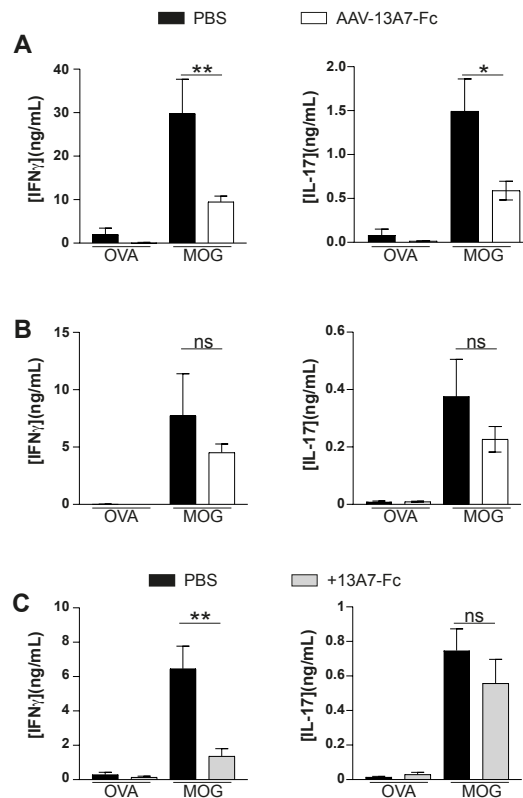


Figure 10. AAV1-13A7-Fc treatment after EAE induction led to drastic reduction of MOG-specific Th1 and Th17 responses in draining lymph node cultures upon ex vivo antigen rechallenge. To perform antigen-recall studies, draining lymph node (DLN) cells from PBS- and AAV1-13A7-Fc-treated mice were collected at the peak (**panel A**, on day 18 post-immunization) and the chronic phase (**panel B**, on day 31) of the disease (n=8/time of sacrifice), and stimulated with MOG₃₅₋₅₅ (at 20 μ g/mL) or the irrelevant antigen ovalbumin (OVA, 20 μ g/mL) *in vitro* for 72 hours. Th1 and Th17 proinflammatory cytokine secretion (*i.e.* IFN- γ and IL-17, respectively) into the culture supernatants were measured by ELISA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns = not significant (*Mann-Whitney test*).

These results support that the inhibition of P2RX7 by 13A7-Fc nanobody may impair the stimulation and/or generation of peripheral autoreactive Th1 and Th17 in AAV-treated EAE mice.

Discussion

Our data complete the *in vivo* pharmacodynamics studies of bivalent nanobodies obtained from our previous studies using the AAVnano methodology [31]. After a unique i.m. injection of recombinant AAV-13A7-Fc vectors (at 10^{11} vg/mouse), the results revealed a high transduction efficiency and good nanobody *in vivo* tolerance as illustrated by long-term Nb production with constantly increasing levels maximizing on day 56 and persisting until at least 98 days. This kinetic is in line with what it is known using AAV vectors, which generally allow a systemic apparition of the transgenic protein within one to two weeks post-AAV transduction [32-34]. In addition, we found long-term (*i.e.* for 98 days) *in vivo* binding and modulation of P2RX7 in immune cells within both peripheral (splenic T cells) and CNS (microglia) tissues. Likewise, in a previous study, although using a bivalent half-life extended dimer format (dim-HLE, including a fusion of a Nb dimer to an albumin-specific Nb named Alb8) of P2RX7-specific antagonist nanobodies, we demonstrated that a single i.m. injection of AAV1 coding for bivalent dim-HLE Nbs resulted in extensive occupancy of P2RX7 on peripheral cells (*i.e.* kidney cells) and microglia for 4 months post-injection [31].

Furthermore, here, we performed a more precise kinetic study, which revealed a robust 13A7-Fc Nb P2RX7 binding and inhibition (*i.e.* reduced DAPI incorporation and CD62L/CD27 shedding) in splenic cells as soon as day 3 after i.m. injections. Moreover, we showed for the first time that a 7-day exposure to the Nbs was sufficient to efficiently launch a long-term P2RX7 internalization, acting as an indirect path to complete inhibition of the receptors. In addition, in microglia, we observed close binding

and functionality properties despite a delay of about 7 days in comparison with splenic T cells. We speculate that this delay may be a consequence of the BBB natural barrier. It has been reported that only 0.02% - 0.1% of the injected dose of a conventional recombinant antibody achieves passage into the brain [35]. Whereas the size and format of a recombinant protein may dictate its *in vivo* capacity to circulate through the restrictive BBB, a 13A7-Fc nanobody has a size of 90 kDa, not far from the 150 kDa weight of a recombinant antibody [30]. Another parameter that may play a role is the dose and length of Nb exposure. In a previous experiment using recombinant Nbs, it was possible to achieve complete occupancy and blockade of microglial cell P2RX7 *in vivo*: (i) with a high dose (*i.e.* 3.2 mg, 150 mg/kg) of bivalent dim-HLE Nbs, only four hours following intravenous (*i.v.*) administration and (ii) within minutes by *i.c.v.* Nb injection, even at low dose (*i.e.* 32 µg, 1.5 mg/kg) [31]. These results indicate that penetration into the brain parenchyma requires over 100-fold higher doses of *i.v.* versus *i.c.v.* injected nanobodies; certainly due to the restriction imposed by the BBB. Altogether, our finding here is showing that AAVnano vectors provide both elevated concentrations of functional Nbs and durable Nb exposure, two main parameters that may considerably facilitate the BBB crossing.

Next, we compared the efficacy of one single *i.m.* versus *i.c.* (*i.e.* *i.c.v.* and *i.c.m.*) injection to administer the AAV1-13A7-Fc vectors. Either *i.m.* or *i.c.* administrations resulted in similar Nb binding and functionality efficacy in the spleen. This suggests that *i.c.* AAVnano administration leads to a potent AAVnano transduction and Nb production, as well as a rapid and efficient circulation of macromolecules from the CNS to peripheral tissues. Indeed, in the brain, macromolecules and other waste products are effectively and continuously drained from the parenchyma to the periphery through functional meningeal lymphatic vessels; leading to the brain perfusion by the dynamic

efflux of interstitial fluid (ISF) and influx of cerebrospinal fluid (CSF) [36]. Regarding the CNS, despite a delay of 7 days, Nb binding and functionality on microglia were similar upon i.m. or i.c. injections. In addition, a full blockade of P2RX7 was only found upon i.m. delivery from day 28 and not by i.c. administration. For those reasons and given the fact that intracranial delivery of therapeutic biologics (*i.e.* antibodies) to human patients is often unfeasible, the intramuscular administration was chosen as the optimal AAV delivery method for targeting P2RX7 in the brain and for subsequent experiments with the EAE mouse model.

With the goal of studying the impact of P2XR7 activity regulation by antagonistic Nbs in a model of CNS autoimmune inflammation, we implemented two protocols with different AAVnano administration kinetics. In the first one, the AAV1-13A7-Fc treatment was given three weeks prior to EAE induction, subsequently dampening all P2RX7 functions in both peripheral and CNS tissues. In this context, AAV-treated mice may exhibit a similar EAE pattern as that seen in P2RX7 KO mice [37, 38]. Indeed, this treatment led to an unexpected and heightened EAE pathogenesis in AAV vs. PBS group, suggesting novel physiological functions of P2RX7. This phenotype was accompanied by exacerbated CNS histopathological/neurodegenerative features such as demyelination, immune cell infiltration, reactive microgliosis and astrogliosis. In agreement, multiple studies have demonstrated a central pathological role in EAE for CNS myeloid cells such as resident microglial cells and infiltrating macrophages, as well as astrocytes. Regarding myeloid cells, depending on their phenotypes (*i.e.* pro- and anti-inflammatory) often referred to as M1 and M2 [39], they are source of proinflammatory or anti-inflammatory cytokines and chemokines and can further either amplify the recruitment of immune cells or contribute to the resolution of such immune response. Concerning the role of astrocytes, they are themselves a major source of

chemokines, which promote lymphocyte and monocyte recruitment [40, 41]. In EAE, both encephalitogenic Th1- and Th17-produced cytokines promote microglial and astrocyte activation, therefore sustaining CNS inflammation and damage [42, 43]. Corroborating the above data, we further observed: (i) a hyperactivation of both pathogenic Th17 and Th17.1 subsets in the periphery, (ii) enhanced CNS expression of two hallmark proinflammatory Th cytokines such as IFN- γ (Th1 specific) and IL-17 (Th17 specific), (iii) a trend to a generalized increase of mRNA levels of MCP-1/CCL2 chemokine and CCR5 chemokine receptor, and proinflammatory cytokines (TNF α and IL-6) in the spinal cord, and (iv) as expected reduced mRNA levels of IL-1 β , a key cytokine from the P2RX7-mediated NLRP3 inflammasome pathway at the peak of EAE.

Our present study may reconcile previous opposing data from two studies using P2RX7 KO mice [37, 38]. Indeed, Chen and Brosnan (2006) used the P2RX7 KO mice from Pfizer, with a deficiency in the last exon of the P2RX7 gene, exon 13, altering the expression of both A and K isoforms of the receptors and leading to a complete P2RX7 KO. Notably, knowing that 13A7-Fc Nbs are able to target and block both A and K isoforms of P2RX7, it would be expected that AAV-treated mice resemble the Pfizer KO mice. These KO mice developed enhanced susceptibility to EAE with: (i) more severe clinical and pathological EAE features than wild type (WT) controls, and (ii) a loss of apoptotic but vigorous proliferative activities of KO lymphocytes [37]. Besides its multiple actions during inflammation [5-16], the latter result is in line with the fact that P2RX7 is ultimately involved in cell death and capable of regulating cell homeostasis [11, 16]. Interestingly, our data from AAV-treated mice support that same idea as illustrated with: (i) major increase of CD4conv percentages and cell numbers, particularly in Th17 and Th17.1 subsets in the brain during EAE, and (ii) an abundant

GFAP⁺ (*i.e.* activated astrocytes) and Iba1⁺ (*i.e.* microglia) staining in the spinal cord parenchyma, already visible in naïve mice. Altogether, those observations may suggest that inhibiting P2RX7 before the appearance of any inflammatory and/or neurodegenerative events may result on lymphocyte and glial cells which are more resistant to cell apoptosis and with higher proliferative activity. As such, the hypersensitivity to chronic EAE of AAV-treated mice may rely on the increased cell numbers susceptible to exacerbate: (i) initial acute inflammation and (ii) late progressive and neurodegenerative events during the pathophysiology of EAE.

In contrast, Sharp *et al.* 2008 used the P2RX7 KO mice from Glaxo-Smith-Kline, with a deficiency in the first exon, altering only the A isoform and leading then to a partial P2RX7 KO. The K isoform still present is expressed particularly in T lymphocytes. Even if the reported data may be questionable, these mice exhibited reduced EAE incidence, but diseased KO mice exhibited similar EAE development as WT mice. This phenotype was associated with: (i) increased Th1 and Th17 cytokine production and enhanced activated T cells in the brains of KO mice, even in mice with no clinical signs, and (ii) reduced astroglial activation and axonal damage compared to WT mice [38].

Regarding our second protocol, by administrating AAVnano four days after EAE induction, we aimed to study the impact of P2RX7 blockade by antagonistic Nbs when both (immunization and initial effector phases of EAE development have been triggered. We found that blocking P2RX7 during EAE development ameliorated EAE pathology (*i.e.* improved clinical assessments) in AAV vs. PBS mice. During the immunization phase of EAE, encephalitogenic T cells against a myelin antigen are generated in the DLNs close to the immunization site, acquiring proinflammatory Th1 and Th17 profiles [44]. In agreement, P2RX7 has been linked to T cell activation,

differentiation and apoptosis [45]. In fact, studies have highlighted its implication in Th1 and Th17 cell polarization [45, 46]. Indeed, recently, it has been shown that P2X7R signaling enhances Th17 responses *in vitro* [46]. In line with these studies, we found that the AAV mice exhibited a defect in the immunization phase, as illustrated by altered stimulation and/or generation of peripheral autoreactive DLN Th1 and Th17 cells. In agreement with the purported deleterious actions of these cells upon migration to the CNS, we reported here that the beneficial effects of the AAV treatment also block the effector phase of the disease with: (i) a potential impairment of immune cell recruitment to the CNS as illustrated by the reduced histopathological scores and a significant reduction of the expression of chemokines (MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5) and (ii) a disrupted engagement of CNS local proinflammatory responses, as reflected by diminished expression of both proinflammatory (TNF- α and IFN- γ) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) in the spinal cord. In addition, as expected, the AAV treatment led to substantial diminution of NLRP3, ASC, and Caspase-1 of the P2RX7-mediated NLRP3 inflammasome pathway. Notably, our antigen-recall studies using DLN cells from EAE-induced PBS mice highlight a direct immunomodulatory action of recombinant 13A7-Fc nanobody with reduction of IFN γ and IL-17. Given the established roles of P2RX7 as a key mediator of inflammation [5-16] and a previous study using antagonistic small molecules in EAE, although poorly specific for P2RX7 [17], our data are in adequation with our initial hypothesis stating that P2RX7 functions may promote inflammation and that a 13A7-Fc blocking nanobody would ameliorate the severity of the EAE disease.

As previously discussed in Demeules *et al.* 2020 [26], considering that a one-to two-week period is needed for the AAVnano vectors to produce systematically the protein transgene, we would presume that the AAVnano methodology would be mostly

suitable in a prophylactic rather than therapeutic setting [26]. Importantly, our studies prove significant Nb circulation to the CNS and full P2X7 occupancy and blockade in naïve mice, even if we cannot exclude a possible increased permeability of the BBB to macromolecules during EAE due to a transient disruption of this barrier. Nevertheless, our studies highlight that P2RX7 antagonistic Nb presence before vs. after EAE induction generated two opposite EAE phenotypes. This is the first demonstration highlighting that depending on the time of AAVnano administration, the pharmacodynamics and biological actions of the antagonistic nanobodies impact P2RX7 expressing cell targets within peripheral (*i.e.* T and myeloid cells) and CNS (*i.e.* microglia, astrocytes and neurons) tissues, in different inflammatory and neurodegenerative context and lead to two opposite EAE phenotype.

Conclusions

We here demonstrate the efficacy of our AAVnano technology for systemic *in vivo* delivery of Nbs. Our findings provide: (i) understanding of both beneficial and detrimental aspects of P2RX7 during initial acute episodes of inflammation, as well as late progressive and neurodegenerative phase during the pathophysiology of EAE and (ii) the proof-of-concept that P2RX7-antagonistic 13A7-Fc nanobody may be used as potent therapeutic biologic in MS and other chronic inflammatory/autoimmune and related neurological disorders. Moreover, our results: (i) provide new insights into the treatment conditions (*i.e.* prophylactic vs. curative settings) and (ii) highlight the use of AAVnano as a promising strategy to deliver therapeutic molecules to the CNS.

Compared to a direct administration of recombinant Nbs, the AAVnano methodology exhibits several advantages: (i) the absence of need for a daily administration (only one injection necessary), (ii) an efficient cell transduction by the AAVnano providing continued endogenous Nb synthesis, and (iii) sustained long-term systemic high concentrations of the functional nanobody *in vivo* [26]. Nevertheless, given the two EAE phenotypes we observed on two administration settings, one should consider that the permanent and long-term modulation of P2RX7 by AAVnano *in vivo* may also mediate secondary side effects in the mice (*i.e.* immune dysregulation) [26].

Abbreviations

AAV-nano : AAV coding for Nbs

AAV1 : Adeno-associated viral vector 1

Ab/Abs : Conventional
antibody/ antibodies

BBB : Blood brain barrier

BBG : Brilliant blue G

CNS : Central nervous system

CSF : Cerebrospinal fluid

CFA : Complete Freund's adjuvant

DLN : Draining lymph node

EAE : Experimental autoimmune
encephalomyelitis

FcRn : Neonatal Fc-receptor

IgG1 : Fc region of conventional
mouse Ab

IL : Interleukine

ISF : Interstitial fluid

i.c.v. : Intracerebroventricular

i.c.m : Intracisterna magna

i.c. : Intracranial

i.m. : Intramuscularly

i.v. : Intravenous

MFI : Mean fluorescent intensity

mAb : Monoclonal antibody

MS : Multiple sclerosis

MBP : Myelin basic protein

Nb/Nbs : Nanobody/Nanobodies

oATP : oxidized ATP

P2RX7 : P2X7 receptor

PMS : Progressive phase

r.o. : Progressive phase

RRMS : Relapsing-remitting MS

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Animal experimentation guidelines dictated by the ethical committee for animal experimentation, CENOMEXA N°54 and by the French ministry (Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) were followed (agreement number B7645005).

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

Data supporting the conclusions are presented in the manuscript. Any information regarding the animal model, the experimental methods used, and the data in this paper are available to scientific communities upon direct contact to the authors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported in part by ANR-DFG, and co-supported by European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Authors' contributions

Acknowledgements

Not applicable

References

1. la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G: Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol.* 2003;73:339-343.
2. Haag F, Adriouch S, Brass A, Jung C, Moller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, Koch-Nolte F: Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal.* 2007;3:71-81.
3. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC: Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med.* 2012;367:2322-2333.
4. Gombault A, Baron L, Couillin I: ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol.* 2013;3:414.
5. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M, Adriouch S: Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med.* 2010;207:2561-2568.
6. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R: The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev.* 2014;66:638-675.
7. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S: The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017;47:15-31.
8. Karasawa A, Kawate T: Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife.* 2016;5.
9. Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FW: A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011;20:897-915.

10. Hattori M, Gouaux E: Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*. 2012;485:207-213.
11. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F: NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*. 2003;19:571-582.
12. Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F: ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J*. 2008;22:861-869.
13. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, Linton K, Alexander DR, Higgins CF: Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol*. 2005;7:808-816.
14. Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F: NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol*. 2009;182:2898-2908.
15. Pelegrin P, Surprenant A: Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. 2006;25:5071-5082.
16. Qu Y, Dubyak GR: P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal*. 2009;5:163-173.

17. Matute C, Torre I, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodriguez-Antiguedad A, Sanchez-Gomez M, Domercq M: P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*. 2007;27:9525-9533.
18. Taylor SR, Turner CM, Elliott JI, McDaid J, Hewitt R, Smith J, Pickering MC, Whitehouse DL, Cook HT, Burnstock G, et al: P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1275-1281.
19. Anderson CM, Nedergaard M: Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci*. 2006;29:257-262.
20. Cotrina ML, Nedergaard M: Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal*. 2009;5:223-232.
21. Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, Iacenda D, Knop JH, Hammel A, Bergmann P, et al: Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med*. 2016;8:366ra162.
22. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R: Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363:446-448.
23. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauherhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, et al: Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198:157-174.

24. Muyldermans S: Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:775-797.
25. Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES: Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol.* 1997;15:637-640.
26. Demeules M, Scarpitta A, Abad C, Gonde H, Hardet R, Pinto-Espinoza C, Eichhoff AM, Schafer W, Haag F, Koch-Nolte F, Adriouch S: Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Front Oncol.* 2020;10:1699.
27. Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Waschek JA: Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:2012-2017.
28. Abad C, Tan YV, Lopez R, Nobuta H, Dong H, Phan P, Feng JM, Campagnoni AT, Waschek JA: Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:19555-19560.
29. Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Stigter-van Walsum M, Dreier T, de Haard HJ, Leemans CR, van Dongen GA: Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:2288-2297.
30. Scheuplein F, Rissiek B, Driver JP, Chen YG, Koch-Nolte F, Serreze DV: A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* 2010;34:145-154.

31. Pinto-Espinoza C, Guillou C, Rissiek B, Wilmes M, Javidi E, Schwarz N, Junge M, Haag F, Liaukouskaya N, Wanner N, et al: Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs. *Front Pharmacol.* 2022;13:1029236.
32. Adriouch S, Franck E, Drouot L, Bonneau C, Jolinon N, Salvetti A, Boyer O: Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with CTLA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Front Microbiol.* 2011;2:199.
33. Hardet R, Chevalier B, Dupaty L, Naimi Y, Riou G, Drouot L, Jean L, Salvetti A, Boyer O, Adriouch S: Oral-tolerization Prevents Immune Responses and Improves Transgene Persistence Following Gene Transfer Mediated by Adeno-associated Viral Vector. *Mol Ther.* 2016;24:87-95.
34. McCarty DM: Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther.* 2008;16:1648-1656.
35. Pardridge WM: Delivery of Biologics Across the Blood-Brain Barrier with Molecular Trojan Horse Technology. *BioDrugs.* 2017;31:503-519.
36. Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J: The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron.* 2018;100:375-388.
37. Chen L, Brosnan CF: Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol.* 2006;176:3115-3126.
38. Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, Feinstein DL: P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* 2008;5:33.

39. Jiang Z, Jiang JX, Zhang GX: Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett.* 2014;160:17-22.
40. Moreno M, Bannerman P, Ma J, Guo F, Miers L, Soulika AM, Pleasure D: Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci.* 2014;34:8175-8185.
41. Mills Ko E, Ma JH, Guo F, Miers L, Lee E, Bannerman P, Burns T, Ko D, Sohn J, Soulika AM, Pleasure D: Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J Neuroinflammation.* 2014;11:105.
42. Prajeeth CK, Kronisch J, Khorooshi R, Knier B, Toft-Hansen H, Gudi V, Floess S, Huehn J, Owens T, Korn T, Stangel M: Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J Neuroinflammation.* 2017;14:204.
43. Ding X, Yan Y, Li X, Li K, Ciric B, Yang J, Zhang Y, Wu S, Xu H, Chen W, et al: Silencing IFN- γ binding/signaling in astrocytes versus microglia leads to opposite effects on central nervous system autoimmunity. *J Immunol.* 2015;194:4251-4264.
44. Rangachari M, Kuchroo VK: Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun.* 2013;45:31-39.
45. Rivas-Yanez E, Barrera-Avalos C, Parra-Tello B, Briceno P, Roseblatt MV, Saavedra-Almarza J, Roseblatt M, Acuna-Castillo C, Bono MR, Sauma D: P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate. *Int J Mol Sci.* 2020;21.
46. Yang Y, Story ME, Hao X, Sumpter TL, Mathers AR: P2X7 Receptor Expression and Signaling on Dendritic Cells and CD4(+) T Cells is Not

Required but Can Enhance Th17 Differentiation. *Front Cell Dev Biol.*

2022;10:687659.

IV. Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

P2RX7 permet la régulation de la réponse immunitaire en réponse aux signaux de danger (ATP et NAD) libérés lors de situations inflammatoires ou de lésions tissulaires. En raison notamment de son rôle dans la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1- β et IL-18 *via* l'activation de l'inflammasome NLRP3) et dans la mort des lymphocytes T (LyT) notamment régulateurs (Treg), P2RX7 semble être une cible prometteuse dans le traitement de pathologies inflammatoires chroniques et notamment dans les pathologies du SNC. Il a été rapporté que l'inhibition de P2RX7 permettait une réduction des réponses inflammatoires dans plusieurs modèles d'inflammation comme la néphrite à médiation par Ac (glomérulonéphrite) (Taylor *et al.* 2009), le modèle EAE (Matute *et al.* 2007) et l'accident vasculaire cérébral (Melani *et al.* 2006) Cependant, ces études utilisaient de petites molécules pharmacologiques inhibitrices de P2RX7 (par exemple, le BBG ou oATP). Ces molécules souffrent d'un manque de spécificité avec des effets secondaires hors cible, et d'une pharmacodynamique hétérogène. C'est pourquoi l'utilisation d'anticorps thérapeutiques plus enviable, est de plus en plus développée. En effet, ils présentent une spécificité importante de leur cible, une pharmacodynamique homogène et une faible toxicité. L'utilisation de nanocorps (Ncs) apporte des avantages supplémentaires par rapport aux anticorps classiques dont leur petite taille, leur haute stabilité et solubilité et leur excellente pénétration dans les tissus *in vivo* et leur structure même (CDR3 plus long) qui leur permet d'atteindre et de moduler des sites catalytiques. De plus, on peut facilement les modifier en le liant, par exemple, à d'autres Ncs, à des domaines Fc, à des tags, des toxines ou radionucléides,... Tout cela les rend particulièrement adaptés pour le ciblage *in vivo* et la modulation de leur cible.

Une collaboration entre notre laboratoire et le laboratoire de Koch-Nolte en Allemagne a permis de développer et d'optimiser des Ncs spécifiques de P2RX7 bloquant (13A7, 1C81 et 8G11) et potentialisant (14D5) à demi-vie prolongée (sous le format dimHLE ou Fc). Suite à des tests *in vivo* antérieurs, deux constructions ont été choisies et utilisées dans ce projet de thèse : le Ncs 13A7-Fc ayant le pouvoir bloquant, le plus important et le Ncs 14D5-DimHLE ayant le pouvoir potentialisant, le plus important. Le Ncs 14D5-DimHLE est un dimère de Ncs couplé à un Ncs anti-albumine (HLE) permettant d'augmenter sa demi-vie *in vivo*. Le Ncs 13A7-Fc lui est coupé à une région Fc d'une IgG1 issue d'un anticorps conventionnel murin portant une mutation LSF. Cette mutation permet une meilleure affinité avec le FcRn afin d'augmenter leur demi-vie. Ces constructions présentent une forte spécificité pour P2RX7 et ne reconnaissent pas ses paralogues, les plus proches (P2RX4 et P2RX1) (Danquah *et al.* 2016). Or, cette forte spécificité entraîne également une absence de réactivité croisée avec des P2RX7 d'autres espèces, limitant alors leur utilisation dans des études translationnelles. Ainsi, nos Ncs 13A7 et 14D5 reconnaissent uniquement le P2RX7 murin. Cette limitation est également

présente avec les anticorps conventionnels et les molécules pharmacologiques qui peuvent présenter un pouvoir modulateur différent chez les animaux par rapport à l'Homme. L'utilisation par administration systémique (intraveineux, i.v.) de ces nanocorps anti-P2RX7 dans un modèle murin de glomérulonéphrite, a efficacement inhibé (13A7-dimHLE) ou potentialisé (14D5-dimHLE) la protéinurie 15 jours après l'induction de la maladie (Danquah *et al.* 2016).

Sachant les limites associées à l'utilisation de Ncs recombinant, le laboratoire s'est intéressé à la méthodologie AAVnano qui présente plusieurs avantages. C'est une approche efficace et sûre déjà utilisée en thérapie génique permettant : (i) une production *in situ* à long-terme d'une protéine transgénique donnée (Wang *et al.* 2019), (ii) d'éviter les injections répétées. Comme cela est nécessaire avec les Ncs recombinants (Demeules *et al.* 2020) et (iii) d'obtenir une concentration saturante stable conférant une pharmacocinétique plus favorable, contrairement aux injections systémiques répétées d'un Ncs recombinant qui entraînent des alternances de pic / de diminution de concentrations (Demeules *et al.* 2020). Nous avons ainsi mis en place la technologie AAVnano comme outil de production de nos Ncs dans le laboratoire. Elle consiste en l'utilisation d'un vecteur AAV1 codant pour soit le Nc 13A7-Fc, soit le Nc 14D5-dimHLE. Pour évaluer la pharmacodynamique de ces Ncs *in vivo*, deux tests ont été développés sur la base d'analyse par cytométrie en flux : un test cellulaire de fixation pour déterminer le taux d'occupation de P2RX7 (*i.e.* utilisation d'Ac anti-Ncs) et un test d'inhibition par les Ncs (*i.e.* mesure du taux de blocage en fonction d'une réduction de l'incorporation de DAPI et du *shedding* (élimination) des marqueurs CD62L/CD27 issus des lymphocytes). Ces AAVnano injectés une seule fois en intramusculaire (i.m. à 10^{11} génomes viraux par souris (vg/souris)) permettent une production à long-terme et une fixation et modulation de l'activité de P2RX7 (*i.e.* sur la base du *shedding* des marqueurs CD62L et CD27) au niveau des cellules en périphérie jusqu'à 120 jours. Cela est accompagné par des concentrations sériques comprises entre 30 et 50 $\mu\text{g/mL}$ après 14 et 21 jours post-injection, puis un plateau atteint aux alentours de 100 $\mu\text{g/mL}$ à 30 et 120 jours (Article 1 - Abad *et al.* 2023 soumis). Cette longévité de production et cette forte concentration de Ncs dans le sérum suggèrent : (i) une grande efficacité de transduction des AAVnano générés et (ii) une bonne tolérance des AAV et des nanocorps *in vivo*, supportant l'idée que l'administration d'AAVnano n'induit pas ou peu de réponses immunitaires anti-AAV ou anti-Ncs. Cette pharmacocinétique favorise ainsi une meilleure biodisponibilité et pénétration tissulaire. Cependant, la production du transgène après injection des AAV, est connue pour avoir une cinétique lente et de ce fait, implique l'utilisation des AAVnano dans un premier temps en prophylaxie (*i.e.* trois semaines avant induction du modèle murin).

Pour ces raisons, dans notre étude pour tester et valider la méthodologie AAVnano dans des modèles de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI, modèles de colite induite par le DSS), nous avons choisi un traitement préventif de trois semaines avant induction de la colite. Dans le cadre des MICI, de nombreuses études suggèrent un rôle de l'ATP et de P2RX7 dans leur physiopathologie et soulignent un potentiel thérapeutique. Notamment, P2RX7 est surexprimé dans l'intestin au niveau des cellules immunitaires et non immunitaires chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Neves *et al.* 2014), mais également dans des modèles murins de colite induite par le DSS (Saber *et al.* 2021). De plus, plusieurs études utilisant des souris déficientes pour P2RX7 ont montré une amélioration de l'inflammation intestinale dans des modèles de MICI induits par soit le TNBS ou le DSS (Cesaro *et al.* 2010 ; Saber *et al.* 2021 ; Hofman *et al.* 2015). Dans nos expériences, une seule injection i.m. d'AAVnano à raison de 10^{11} gv/souris permettait une production suffisante de Ncs pour bloquer ou potentialiser P2RX7 à long-terme *in vivo* (Article 1 - Abad *et al.* 2023 soumis). Comme attendu, en condition préventive (*i.e.* trois semaines avant induction du modèle murin), les AAV codant pour le Ncs bloquant (13A7-Fc) ont permis de diminuer significativement : les symptômes, les scores cliniques et histopathologiques (*i.e.* infiltrations immunes et perte des cryptes) et l'inflammation (*i.e.* cytokines proinflammatoires) dans des modèles aiguë et chronique de colite induite par le DSS (Article 1 - Abad *et al.* 2023 soumis). En contraste, le Ncs potentialisateur 14D5-dimHLE, quant à lui, aggrave ces différents paramètres, même si ses effets restent plus modestes que le Nc 13A7-Fc (Article 1 - Abad *et al.* 2023 soumis). Ainsi, cette étude : (i) apporte la preuve de concept de l'utilisation de la méthodologie AAVnano afin de délivrer *in vivo* des protéines thérapeutiques dans des pathologies inflammatoires chroniques et (ii) valide l'importance de P2RX7 comme cible thérapeutique dans les MICI.

Dans le cadre des pathologies du SNC, l'utilisation des anticorps est plus compliquée puisqu'ils doivent faire face à la présence physique de barrières naturelles dans ce tissu, notamment la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, il a été rapporté que seulement moins de 0,1% de la dose injectée d'un anticorps recombinant conventionnel parvient à passer la BHE afin de se retrouver dans le cerveau (Abuqayyas and Balthasar 2013). Or, la taille et le format d'une protéine recombinante peuvent dicter sa capacité *in vivo* à circuler à travers la BHE. L'utilisation de Ncs est ainsi proposée. En effet, les Ncs sont plus petits (15 kDa) que les Ac conventionnels (150 kDa) et exhibent par conséquent un pouvoir de pénétration tissulaire bien plus important. Afin d'optimiser le ciblage de P2RX7 *in vivo*, nos nanocorps ont été modifiés comme mentionné ci-dessus : (i) ils sont bispécifiques avec deux domaines de liaison (*i.e.* dimère de Ncs) augmentant leur spécificité vis-à-vis du P2RX7 et (ii) ils présentent un couplage avec soit un Ncs anti-albumine (HLE), soit une région Fc d'une IgG1 murine, permettant d'augmenter leur demi-vie *in vivo*. De ce fait, ils ont un poids moléculaire bien plus important : 45 kDa pour les Ncs DimHLE et 90 kDa pour les Ncs Fc, non loin du poids de 150 kDa d'un anticorps

classique. Leur passage au travers de la BHE et leur pénétration dans le tissu cérébral restent à être déterminés. Notre objectif était donc d'évaluer leur adressage vers le SNC selon différentes voies d'injections de deux nanocorps bloquant P2RX7 : 13A7 qui bloque uniquement le P2RX7 murin et le 1c81s qui lui bloque à la fois le P2RX7 murin et humain, le rendant intéressant pour des études translationnelles. Ces Ncs diffèrent par leur point isoélectrique, respectivement de 5,9 et 9,7. L'idée était de voir si un point isoélectrique augmenté permettrait une augmentation de la pénétration des Ncs dans le SNC, *via* l'interaction avec le glycocalyx (*i.e.* un revêtement fibrillaire présent à la surface cellulaire) qui est chargé négativement à la surface de la BHE. L'évaluation de la pharmacodynamique de ces Ncs *in vivo*, a été réalisée en utilisant les tests cellulaires de fixation et d'inhibition

Pour les Ncs recombinant au format DimHLE, deux voies d'injections ont été utilisées : intraveineuses (*i.v.*) ou intracérébrales (*i.c.*) (intracérébroventriculaire (*i.c.v.*)). Les résultats montrent après injection *i.v.* que : (i) une faible dose de Ncs (0,15 mg/kg) suffit à fixer et à inhiber P2RX7 à la surface des lyT résidents du rein (TRM) et (ii) pour obtenir un ciblage efficace de P2RX7 sur la microglie, une forte dose (150 mg/kg) est alors nécessaire ; une dose 100 fois plus élevée que le rein certainement due à la BHE (Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022).

Par ailleurs, les Ncs injectés par *i.v.* transloquent efficacement le parenchyme rénal, mais pas la BHE. Ce résultat est obtenu peu importe la taille du Ncs ou le point isoélectrique (pI) (Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022); donc l'augmentation de ce dernier ne permet pas d'améliorer la pénétrance cérébrale, contrairement à ce qu'il a été rapporté dans des études précédentes (Li et al 2012 et 2016). Cette différence entre ces études et la nôtre est sûrement due à une différence de taille, Li et collaborateurs ont utilisé des Ncs monomériques de 15 kDa. Ces résultats sont cohérents avec les anticorps monoclonaux, montrant qu'à peine 0,7% de la dose injectée en *i.v.* passait la BHE (Abuqayyas and Balthasar 2013). Toutefois, un ciblage et blocage efficaces de P2RX7 sur la microglie *in vivo* peuvent facilement être obtenus par injection *i.c.v.* de ces nanocorps antagonistes, même à faibles doses (0,5 mg/kg). De manière surprenante pour les cellules périphériques rénales (TRM), après une injection *i.c.v.*, même une faible dose (0,15 mg/kg) suffit à obtenir une occupation et une inhibition maximale (Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022). Une explication possible est qu'il existe une circulation rapide et efficace des macromolécules du SNC vers les tissus périphériques. En effet, dans le cerveau, les macromolécules et autres déchets sont efficacement et continuellement drainés du parenchyme vers la périphérie à travers des vaisseaux lymphatiques méningés ; conduisant à la perfusion du cerveau par l'efflux dynamique du liquide interstitiel (ISF) et l'afflux du liquide céphalo-rachidien (CSF) (Sandro Da Mesquita et al. 2018). Un inconvénient majeur de cette approche (injection *i.c.v.*) est qu'elle nécessite une neurochirurgie et qu'elle est donc invasive pouvant altérer les caractéristiques du tissu. De ce fait, l'administration *i.c.v.* de produits biologiques thérapeutiques (*i.e.* anticorps) à des patients

est souvent irréalisable. Une autre limitation est la diffusion lente dans le parenchyme nerveux entraînant une diminution progressive de la concentration du médicament injecté à partir du site d'injection. Par exemple, il a été montré qu'après injection i.c.v. chez le rat d'un médicament, sa concentration diminuait jusqu'à 10 fois à chaque mm de distance du site d'injection (Pardridge 2012). Dans notre étude, les constructions 13A7-dim HLE et 1c81-dimHLE ont diffusé pendant 18 à 48h après l'injection des Ncs (Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022). Aux deux temps, une occupation et inhibition complètes de P2RX7 ont été atteintes, suggérant un effet jusqu'à 48h. Il serait intéressant d'analyser plus en détail la cinétique de redistribution des nanocorps après injections i.c.v. (*i.e.* temps plus précoce et plus tardif).

Nous venons de voir ainsi les limites associées à l'utilisation des Ncs recombinant. Pour la suite, nous avons testé la biodistribution des Ncs avec la méthodologie AAVnano utilisant des AAV1 (à des doses de 10^{11} vg par souris) codant pour le Ncs 13A7-Fc en comparant différentes voies d'injection (intracérébrales (i.c.v. ou intra cisterna magna (i.c.m)) versus i.m.). Concernant les injections intracérébrales (i.c.v ou i.c.m), nous montrons qu'après une seule injection des AAVnano, une inhibition complète de P2RX7 au niveau des cellules microgliales dès 7 jours ; un effet persistant jusqu'à 28 jours. Les mêmes cinétiques de fixation et d'inhibition des Ncs ont été retrouvées en périphérie (*i.e.* TRM ou LyT issus de rate) (Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022 ; Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Ces résultats soulignent une haute efficacité de transduction des AAVnano après des injections intracérébrales, permettant la production stable et durable de Ncs fonctionnels *in situ* dans le SNC et leur diffusion rapide vers la périphérie *via* la circulation lymphatique (*i.e.* efflux d'ISF et afflux du CSF (Sandro Da Mesquita *et al.* 2018).

En parallèle, après une injection i.m. unique de vecteurs AAV-13A7-Fc recombinants, les résultats ont révélé également une grande efficacité de transduction et une bonne tolérance des nanocorps (*i.e.* faibles réponses anti-Ncs) *in vivo*, comme l'illustre la cinétique de production de Nb à long terme avec des niveaux en constante augmentation, maximisant au jour 56 et persistant jusqu'à au moins 98 jours (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Ces données confirment nos études précédentes (Article 1 - Abad *et al.* 2023 soumis). De plus, nous obtenons une inhibition partielle de P2RX7 à la surface des lyT à la périphérie (*i.e.* rate) dès 3 jours après injection et un blocage complet atteint à 7 jours qui dure jusqu'à 98 jours. Au niveau microgliale, une inhibition partielle de plus de 50% est observée dès 14 jours et cette inhibition est complète du jour 21 jusqu'à 98 jours (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Malgré un retard au niveau de la microglie, nos résultats sont remarquables. En effet, avec une injection unique « périphérique » (i.m. versus i.c.) d'AAVnano, nous démontrons clairement le passage de Ncs fonctionnels (*i.e.* ciblage et inhibition spécifique de P2RX7) au travers de

la BHE et leur présence dans le SNC (*i.e.* modulation microgliale de P2RX7 par les Ncs). Ce retard est certainement associé à la durée de transduction des cellules musculaires par les AAVnano, afin d'atteindre *in vivo* une dose suffisante de Ncs permettant le passage de la BHE. Nous avons d'ailleurs précédemment mis en évidence que la pénétration dans le SNC nécessitait des doses 100 fois plus élevées de Ncs recombinant injectés par voie i.v. que par voie i.c.v. (Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022). Ce travail apporte la preuve de concept que la méthodologie AAVnano capable de fournir à long-terme (*i.e.* au moins 98 jours) des concentrations élevées de Ncs fonctionnels, permet leur adressage vers le SNC (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation. Cela a permis de décrire une pharmacocinétique bien plus détaillée (*i.e.* points d'analyse précoces du dosage, des taux de fixation et d'inhibition des Ncs à la surface des cibles exprimant P2RX7 dans le SNC (microglie) et à la périphérie (LyT spléniques) à l'issue d'une injection i.m. unique des AAVnano par rapport à nos travaux précédents (Article 1 - Abad *et al.* 2023 soumis ; Article 2 - Pinto-Espinoza *et al* 2022).

En outre, de façon intéressante, après 7 jours, le Ncs 13A7-Fc n'est plus détectable par nos tests par cytométrie en flux. Ce même quand, on ajoute une dose saturante de Ncs recombinant aux cellules étudiées (*i.e.* microglie et cellules spléniques) soulignant une réduction de P2RX7 à leur surface (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation. Cette observation a été confirmée par Western-blot (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Ces données suggèrent ainsi une internalisation de P2RX7 induite par le 13A7-Fc, agissant comme une voie supplémentaire d'inhibition des récepteurs. Potentiellement, cela expliquerait pourquoi son pouvoir bloquant est plus important que pour la forme 13A7-DimHLE (Danquah *et al.* 2016). Ce même phénomène pourrait également intervenir pour les constructions de Ncs sous le format Ncs-Fc (*i.e.* Ncs 14D5-Fc).

Pour ces raisons et compte tenu du fait que l'administration i.c. chez des patients est souvent inappropriée, l'administration i.m. été choisie comme méthode optimale d'administration d'AAVnano pour cibler P2RX7 dans le cerveau et pour les expériences ultérieures avec le modèle murin de la SEP d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chronique.

Nous avons mis en œuvre deux protocoles avec différentes cinétiques d'administration de l'AAVnano. Dans le premier protocole, en condition prophylactique, le traitement AAV1-13A7-Fc a été administré trois semaines avant l'induction de l'EAE, ce qui a eu pour effet d'inhiber toutes les fonctions de P2RX7. Dans ce contexte, les souris traitées par AAV (souris AAV) peuvent être considérées proche des souris P2RX7 KO. Dans ces conditions, on observe une exacerbation inattendue de l'EAE chez les souris AAV

(vs. PBS), suggérant de nouvelles fonctions physiologiques de P2RX7 (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Ce phénotype est accompagné d'une augmentation des caractéristiques histopathologiques et neurodégénératives du SNC associées à l'EAE, telles que la démyélinisation, l'infiltration de cellules immunitaires, la microglie réactive et l'astroglie (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). En ce sens, de nombreuses études ont démontré que les cellules myéloïdes du SNC telles que les cellules microgliales résidentes et les macrophages infiltrants, ainsi que les astrocytes, jouent un rôle pathologique central dans l'EAE. Nous avons également observé : (i) une hyperactivation des lymphocytes Th17 et Th17.1 pathogènes dans les ganglions drainants, (ii) une expression accrue de l'IFN- γ (spécifique à Th1) et l'IL-17 (spécifique à Th17), deux cytokines essentielles pour l'EAE, (iii) une tendance à l'augmentation généralisée de l'expression de chimiokines, récepteurs de chimiokine et de cytokines pro-inflammatoires dans la moelle épinière et (iv) comme prévu, une réduction des niveaux d'ARNm d'IL-1 β , une cytokine clé de la voie de l'inflammasome NLRP3 médiée par P2RX7 (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Notre étude pourrait réconcilier les données opposées de deux études utilisant des souris P2RX7 KO (Chen et Brosnan 2006, Sharp *et al.* 2008). En effet, Chen et Brosnan ont utilisé les souris P2RX7 KO de Pfizer, qui exhibent une altération de l'expression des isoformes A et K des récepteurs et conduisant à une P2RX7 KO complète. Ils observaient également une exacerbation de l'EAE (Chen et Brosnan 2006). Ce travail suggère que les Nbs 13A7-Fc sont capables de cibler et de bloquer les deux isoformes A et K de P2RX7 chez nos souris AAV.

Par ailleurs, ils expliquaient leur effet par une perte des activités apoptotiques, mais une prolifération vigoureuse des lymphocytes autoréactifs KO (Chen et Brosnan 2006).

De manière intéressante, nos données provenant de souris AAV soutiennent cette même idée, comme l'illustrent les éléments suivants : (i) une augmentation importante des pourcentages et du nombre de lymphocytes T CD4, en particulier Th17 et Th17.1 dans le cerveau pendant l'EAE et (ii) une coloration abondante GFAP⁺ (*i.e.* pour les astrocytes activés) et Iba1⁺ (*i.e.* pour la microglie et les macrophages) dans la moelle épinière, déjà visible chez les souris AAV naïves (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Nous supposons que le blocage de P2RX7 empêcherait donc la mort cellulaire (implication dans l'apoptose et la nécroptose) en faveur d'une activité proliférative plus élevée. Avant même l'induction de l'EAE, cela augmenterait le pool de cellules gliales (*i.e.* microglie et astrocytes activés) et de cellules immunitaires, susceptibles d'exacerber : (i) l'inflammation aiguë initiale et (ii) les événements progressifs tardifs et neurodégénératifs au cours de la pathophysiologie de l'EAE. En revanche, *birèvement*, Sharp *et al.* 2008 ont utilisé les souris P2RX7 KO de Glaxo-Smith-Kline, avec une absence d'expression que de l'isoforme A et conduisant alors à un KO partiel. Les souris KO présentent

une incidence réduite d'EAE, mais quand elles sont malades exhibent un développement d'EAE similaire aux témoins (Sharp *et al.* 2008).

En contraste, dans le second protocole, en administrant les AAVnano quatre jours après l'induction de l'EAE, nous avons constaté que le blocage de P2RX7 pendant le développement de l'EAE, améliorait la pathologie de l'EAE chez les souris AAV par rapport aux souris PBS (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation). Ce travail démontre ici la possibilité d'utiliser la méthodologie AAVnano également en condition curative. Ce phénotype auquel nous nous attendions, est accompagné par une altération de la stimulation et/ou de la génération des LyT Th1 et Th17 autoréactifs périphériques. Supportant ce résultat, il a été mis en évidence que P2RX7 est impliqué dans l'activation, la différenciation et l'apoptose des LyT (Rivas-Yáñez *et al.* 2020). Plus précisément, des études ont mis en évidence son implication dans la polarisation des Th1 et Th17 (Rivas-Yáñez *et al.* 2020, Yang *et al.* 2022). De plus, les effets bénéfiques du traitement AAV entraînent également : (i) une altération potentielle du recrutement des cellules immunitaires dans le SNC, comme l'illustrent les scores histopathologiques réduits et une réduction significative de l'expression des chimiokines et (ii) un engagement perturbé des réponses pro-inflammatoires locales du SNC, reflétées par la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans la moelle épinière. En outre, comme prévu, le traitement par AAVnano a entraîné une diminution substantielle de NLRP3, ASC et Caspase-1 de la voie de l'inflammasome NLRP3 médiée par P2RX7. De manière intéressante, lors de tests *in vitro* de re-stimulation avec du MOG des cellules issues des ganglions lymphatiques drainant de souris PBS EAE (*i.e.* non traitées par les AAV1-13A7-Fc) en présence d'une dose saturante de Ncs recombinant, on observe une diminution de la production d'IFN γ , mais pas d'IL-17 (Article 3 - Guillou *et al.* 2023, en préparation) ; ce qui irait dans le sens de l'étude de Chen et Brosnan (2006)

Suite à ce travail, il serait donc intéressant de faire des études supplémentaires de polarisation ou de mort cellulaire des LyT et de la microglie en présence des Ncs bloquant ou potentialisateur *in vitro*. D'un point de vue *in vivo*, nous pourrions également envisager en utilisant soit les AAVnano, soit les Ncs recombinant : (i) de réaliser une cinétique plus précise de l'effet du blocage de P2RX7 sur la mise en place de la réponse auto-immune, en collectant à des temps plus précoces de l'EAE les cellules issues de ganglions drainant chez des souris traitées ou non soit avec les AAVnano, soit avec les Ncs recombinants bloquant ou potentialisateurs (ii) des études avec l'induction de l'EAE par transfert adoptif (*i.e.* transfert de LyT encéphalitogènes (Th1 et Th17) contre un antigène de la myéline issus de souris EAE vers des souris syngéniques naives) nous permettant de mieux définir les effets des Ncs sur la différenciation/polarisation des LyT et leur capacité de migrer vers le SNC, et (iii) d'utiliser le modèle de Cuprizone qui permet d'étudier les processus de démyélinisation et de remyélinisation sans implication du système immunitaire « périphérique » (hors du SNC). Il est à noter qu'une étude de

Bernal-Chico et collaborateurs en 2020 a montré que dans ce modèle, les souris P2RX7 KO présentaient une réduction de la démyélinisation avec un nombre réduit de microglie et d'astrocytes activés. Ce travail suggère que le blocage de P2RX7 au niveau des cellules du SNC est plutôt bénéfique et donc que l'effet délétère observé au cours de l'EAE chez les souris KO (*i.e.* souris Pfizer et souris AAV traitées en prophylactiques) serait lié au système immunitaire « périphérique ». De plus, pour mieux étudier son rôle sur la microglie qui joue un rôle essentiel dans le développement de l'EAE, il serait intéressant d'utiliser les AAVnano dans le cadre d'un modèle de douleur neuropathique tel que le modèle de lésion des nerfs périphériques (*peripheral nerves injury*, PNI). Ce dernier implique fortement la microglie (Coull *et al.* 2005).

En conclusion, ce projet de thèse a permis de démontrer l'avantage de l'utilisation de la méthodologie AAVnano comme un moyen optimisé de délivrer de nouvelles protéines à valeur thérapeutique, dans le cadre de pathologies inflammatoires chroniques et/ou neurodégénératives (*i.e.* MICI et SEP). Dans nos études, suite à une injection, les vecteurs AAVnano sont capables de produire efficacement à long-terme le transgène protéique (*i.e.* production durable à hautes doses de Ncs fonctionnels). Cela offre un avantage important par rapport aux injections répétées des Ncs recombinant ; une meilleure pharmacocinétique et bio-distribution des Ncs, moins invasif. Cependant, les AAV sont associés avec une cinétique d'expression lente du transgène (*i.e.* 1 à 2 semaines), peu propice pour une utilisation dans des modèles non chroniques et en condition curative. Pour limiter cela, il serait intéressant d'utiliser un vecteur AAV double brin (scAAV) permettant une expression plus rapide du transgène, car il évite l'étape de conversion du génome simple brin en double brin dans le noyau (Wang *et al.* 2019). Il est important de noter que nos études mettent aussi en évidence une circulation significative de Ncs dans le SNC, même si nous ne pouvons pas exclure une possible perméabilité accrue de la BHE aux macromolécules pendant l'EAE. Il s'agit de la première démonstration soulignant qu'en fonction du moment de l'administration de l'AAVnano, la pharmacodynamique et les actions biologiques des Ncs antagonistes ont un impact différentiel (*i.e.* bénéfiques ou néfastes) sur les cibles cellulaires exprimant P2RX7, dans les tissus périphériques (*i.e.* rate, ganglions lymphatiques drainant) et le SNC (*i.e.* la microglie, les astrocytes et les neurones), et conduisent à deux phénotypes d'EAE opposés.

En lien avec ce travail, face à la multiplicité de cellules exprimant P2RX7 (*i.e.* types de tissus, de cellules et de cinétique d'activation), une stratégie en cours de développement dans le laboratoire consiste au couplage de ces Ncs anti-P2RX7 avec un autre Ncs ciblant un type cellulaire particulier, par exemple CD11b pour les cellules myéloïdes et microgliales afin de discriminer l'action de P2RX7 sur un type cellulaire donné (Gondé *et al.* 2021). Enfin, il apparaît compliquer d'envisager une thérapie chez

l'Homme à base d'AAVnano. Son inconvénient majeur est associé à sa capacité de produire à long-terme un transgène donné sans avoir la possibilité d'arrêter son action à un moment précis. Il devient donc important de se focaliser sur les Ncs recombinant et de les optimiser , notamment pour améliorer leur passage à travers la BHE. Une des stratégies possibles serait de coupler ces Ncs avec une molécule ligand des récepteurs de transcytose exprimés à la BHE par exemple (Stanimirovic *et al.* 2014 ; Niewoehner *et al.* 2014).

V. Bibliographie

Bibliographie

- Absinta, Martina et al. 2017. « Human and Nonhuman Primate Meninges Harbor Lymphatic Vessels That Can Be Visualized Noninvasively by MRI ». *eLife* 6: e29738.
- Abuqayyas, Lubna, et Joseph P. Balthasar. 2013. « Investigation of the Role of FcγR and FcRn in mAb Distribution to the Brain ». *Molecular Pharmaceutics* 10(5): 1505-13.
- Adamczyk, Magdalena et al. 2015. « P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2 ». *Journal of Cell Science* 128(24): 4615-28.
- Adinolfi, Elena et al. 2005. « Basal Activation of the P2X7 ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-independent Growth ». *Molecular Biology of the Cell* 16(7): 3260-72.
- Adinolfi, Elena et al. 2010. « Trophic Activity of a Naturally Occurring Truncated Isoform of the P2X7 Receptor ». *The FASEB Journal* 24(9): 3393-3404.
- Adinolfi, Elena et al. 2012. « Expression of P2X7 Receptor Increases in Vivo Tumor Growth ». *Cancer Research* 72(12): 2957-69.
- Adriouch, S. et al. 2001. « Rapid Induction of Naive T Cell Apoptosis by Ecto-Nicotinamide Adenine Dinucleotide: Requirement for Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 2 and a Downstream Effector ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167(1): 196-203.
- Adriouch, Sahil et al. 2007. « NAD⁺ Released during Inflammation Participates in T Cell Homeostasis by Inducing ART2-Mediated Death of Naive T Cells In Vivo¹ ». *The Journal of Immunology* 179(1): 186-94.
- Aeschlimann, Daniel, et Vera Knäuper. 2017. « P2X7 Receptor-Mediated TG2 Externalization: A Link to Inflammatory Arthritis? ». *Amino Acids* 49(3): 453-60.
- Akaishi, Tetsuya, Toshiyuki Takahashi, et Ichiro Nakashima. 2018. « Peripheral Blood Monocyte Count at Onset May Affect the Prognosis in Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 319: 37-40.
- Alfredsson, Lars, et Tomas Olsson. 2019. « Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 9(4): a028944.
- Allsopp, Rebecca C., et Richard J. Evans. 2015. « Contribution of the Juxtatransmembrane Intracellular Regions to the Time Course and Permeation of ATP-Gated P2X7 Receptor Ion Channels* ». *Journal of Biological Chemistry* 290(23): 14556-66.
- Altintas, Isil et al. 2013. « Nanobody-Albumin Nanoparticles (NANAPs) for the Delivery of a Multikinase Inhibitor 17864 to EGFR Overexpressing Tumor Cells ». *Journal of Controlled Release* 165(2): 110-18.
- Amadio, Susanna et al. 2017. « Modulation of P2X7 Receptor during Inflammation in Multiple Sclerosis ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01529> (18 avril 2023).
- Amoroso, F. et al. 2012. « The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of Aerobic Glycolysis ». *Cell Death & Disease* 3(8): e370-e370.

- Amoroso, F. et al. 2015. « The P2X7 Receptor Is a Key Modulator of the PI3K/GSK3 β /VEGF Signaling Network: Evidence in Experimental Neuroblastoma ». *Oncogene* 34(41): 5240-51.
- Andrejew, Roberta et al. 2020. « The P2X7 Receptor: Central Hub of Brain Diseases ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.00124> (10 janvier 2023).
- Anselmi, Fabio et al. 2008. « ATP Release through Connexin Hemichannels and Gap Junction Transfer of Second Messengers Propagate Ca²⁺ Signals across the Inner Ear ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48): 18770-75.
- Antonoli, Luca et al. 2014. « Involvement of the P2X7 Purinergic Receptor in Colonic Motor Dysfunction Associated with Bowel Inflammation in Rats ». *PLOS ONE* 9(12): e116253.
- Armulik, Annika et al. 2010. « Pericytes Regulate the Blood–Brain Barrier ». *Nature* 468(7323): 557-61.
- Arulkumar, Nishkantha. et al. 2011. « A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 20(7): 897-915.
- Ascherio, Alberto et al. 2014. « Vitamin D as an Early Predictor of Multiple Sclerosis Activity and Progression ». *JAMA neurology* 71(3): 306-14.
- Ascherio, Alberto, et Cassandra L. Munger. 2016. « Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention—An Update ». *Seminars in Neurology* 36(02): 103-14.
- Aspelund, Aleksanteri et al. 2015. « A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules ». *Journal of Experimental Medicine* 212(7): 991-99.
- Astier, Anne L., et David A. Hafler. 2007. « Abnormal Tr1 Differentiation in Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 191(1): 70-78.
- Atchison, Robert W., Bruce C. Casto, et William McD. Hammon. 1965. « Adenovirus-Associated Defective Virus Particles ». *Science* 149(3685): 754-56.
- Attfield, Kathrine E. et al. 2022. « The Immunology of Multiple Sclerosis ». *Nature Reviews Immunology* 22(12): 734-50.
- Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). 2009. « Genome-Wide Association Study Identifies New Multiple Sclerosis Susceptibility Loci on Chromosomes 12 and 20 ». *Nature Genetics* 41(7): 824-28.
- Bannas, Peter, Julia Hambach, et Friedrich Koch-Nolte. 2017. « Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01603> (31 mai 2023).
- Barberà-Cremades, Maria et al. 2012. « P2X7 Receptor-Stimulation Causes Fever via PGE₂ and IL-1 β Release ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26(7): 2951-62.
- Barden, Nicholas et al. 2006. « Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Genes in the Chromosome 12Q24.31 Region Points to P2RX7 as a Susceptibility Gene to Bipolar Affective

- Disorder ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 141B(4): 374-82.
- Baroja-Mazo, Alberto, Maria Barberà-Cremades, et Pablo Pelegrín. 2013. « The Participation of Plasma Membrane Hemichannels to Purinergic Signaling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828(1): 79-93.
- Bar-Or, Amit et al. 2010. « Abnormal B-Cell Cytokine Responses a Trigger of T-Cell–Mediated Disease in MS? » *Annals of Neurology* 67(4): 452-61.
- Barr, Tom A. et al. 2012. « B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6–producing B cells ». *Journal of Experimental Medicine* 209(5): 1001-10.
- Barros-Barbosa, Aurora R. et al. 2016. « Up-Regulation of P2X7 Receptor–Mediated Inhibition of GABA Uptake by Nerve Terminals of the Human Epileptic Neocortex ». *Epilepsia* 57(1): 99-110.
- Bartlett, Rachael, Leanne Stokes, et Ronald Sluyter. 2014. « The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease ». *Pharmacological Reviews* 66(3): 638-75.
- Bartlett, Rachael, Justin J. Yerbury, et Ronald Sluyter. 2013. « P2X7 Receptor Activation Induces Reactive Oxygen Species Formation and Cell Death in Murine EOC13 Microglia ». *Mediators of Inflammation* 2013: 271813.
- Baruch, Kuti et al. 2013. « CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(6): 2264-69.
- Beaino, Wissam et al. 2017. « Purinergic receptors P2Y12R and P2X7R: potential targets for PET imaging of microglia phenotypes in multiple sclerosis ». *Journal of Neuroinflammation* 14(1): 259.
- Beamer, Edward, Wolfgang Fischer, et Tobias Engel. 2017. « The ATP-Gated P2X7 Receptor As a Target for the Treatment of Drug-Resistant Epilepsy ». *Frontiers in Neuroscience* 11: 21.
- Beigi, Reza D, Sylvia B Kertesz, Gretchen Aquilina, et George R Dubyak. 2003. « Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms ». *British Journal of Pharmacology* 140(3): 507-19.
- Belbasis, Lazaros et al. 2015. « Environmental Risk Factors and Multiple Sclerosis: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses ». *The Lancet Neurology* 14(3): 263-73.
- Benzaquen, Jonathan et al. 2019. « Alternative Splicing of P2RX7 Pre-Messenger RNA in Health and Diseases: Myth or Reality? » *Biomedical Journal* 42(3): 141-54.
- Berer, Kerstin et al. 2011. « Commensal Microbiota and Myelin Autoantigen Cooperate to Trigger Autoimmune Demyelination ». *Nature* 479(7374): 538-41.
- Berer, Kerstin et al. 2017. « Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(40): 10719-24.

- Berland, Léa et al. 2021. « Nanobodies for Medical Imaging: About Ready for Prime Time? » *Biomolecules* 11(5): 637.
- Bernal-Chico, Ana et al. 2020. « P2x7 Receptors Control Demyelination and Inflammation in the Cuprizone Model ». *Brain, Behavior, & Immunity - Health* 4: 100062.
- Bhattacharya, Anindya, et Declan N. C Jones. 2018. « Emerging Role of the P2X7-NLRP3-IL1 β Pathway in Mood Disorders ». *Psychoneuroendocrinology* 98: 95-100.
- Bian, Shu et al. 2013. « P2X7 Integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-MTOR Signaling Pathways to Mediate Tumor Cell Death ». *PLOS ONE* 8(4): e60184.
- Bianco, Fabio et al. 2006. « A Role for P2X7 in Microglial Proliferation ». *Journal of Neurochemistry* 99(3): 745-58.
- Bjornevik, Kjetil et al. 2022. « Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis ». *Science* 375(6578): 296-301.
- Boison, Detlev, et Gennady G. Yegutkin. 2019. « Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy ». *Cancer Cell* 36(6): 582-96.
- BRADFORD, Michelle D., et Stephen P. SOLTOFF. 2002. « P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C ». *Biochemical Journal* 366(3): 745-55.
- Bradley, Helen J., Jocelyn M. Baldwin, et al. 2011. « Residues 155 and 348 Contribute to the Determination of P2X7 Receptor Function via Distinct Mechanisms Revealed by Single-Nucleotide Polymorphisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(10): 8176-87.
- Brady, Jacqueline M., David Baltimore, et Alejandro B. Balazs. 2017. « Antibody Gene Transfer with Adeno-Associated Viral Vectors as a Method for HIV Prevention ». *Immunological Reviews* 275(1): 324-33.
- Buell, G. N. et al. 1998. « Gene Structure and Chromosomal Localization of the Human P2X7 Receptor ». *Receptors & Channels* 5(6): 347-54.
- Burnstock, G. 2012. « Discovery of Purinergic Signalling, the Initial Resistance and Current Explosion of Interest ». *British Journal of Pharmacology* 167(2): 238-55.
- Burnstock, Geoffrey. 2016. « Purinergic Signalling in the Gut ». In *The Enteric Nervous System: 30 Years Later*, Advances in Experimental Medicine and Biology, éd. Stuart Brierley et Marcello Costa. Cham: Springer International Publishing, 91-112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27592-5_10 (11 avril 2023).
- Burnstock, Geoffrey, Louise C. Evans, et Matthew A. Bailey. 2014. « Purinergic Signalling in the Kidney in Health and Disease ». *Purinergic Signalling* 10(1): 71-101.
- Burnstock, Geoffrey, et Gillian E. Knight. 2004. « Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems ». In *International Review of Cytology*, Academic Press, 31-304. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769604400023> (16 décembre 2022).

- Butzkueven, Helmut et al. 2020. « Long-Term Safety and Effectiveness of Natalizumab Treatment in Clinical Practice: 10 Years of Real-World Data from the Tysabri Observational Program (TOP) ». *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 91(6): 660-68.
- Cadavid, D. et al. 2009. « Efficacy of Treatment of MS with IFN β -1b or Glatiramer Acetate by Monthly Brain MRI in the BECOME Study ». *Neurology* 72(23): 1976-83.
- Calzaferri, Francesco et al. 2020. « The Purinergic P2X7 Receptor as a Potential Drug Target to Combat Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases ». *Medicinal Research Reviews* 40(6): 2427-65.
- Campos, Nathalia Enes de et al. 2012. « Characterizing the Presence and Sensitivity of the P2X7 Receptor in Different Compartments of the Gut ». *Journal of Innate Immunity* 4(5-6): 529-41.
- Cao, Fan et al. 2019. « P2X7 Receptor: A Potential Therapeutic Target for Autoimmune Diseases ». *Autoimmunity Reviews* 18(8): 767-77.
- Carmo, Marta R. S. et al. 2014. « The P2X7 Receptor Antagonist Brilliant Blue G Attenuates Contralateral Rotations in a Rat Model of Parkinsonism through a Combined Control of Synaptotoxicity, Neurotoxicity and Gliosis ». *Neuropharmacology* 81: 142-52.
- Cekanaviciute, Egle et al. 2017. « Gut Bacteria from Multiple Sclerosis Patients Modulate Human T Cells and Exacerbate Symptoms in Mouse Models. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(40): 10713-18.
- Chari, Divya M. 2007. « Remyelination In Multiple Sclerosis ». *International Review of Neurobiology* 79: 589-620.
- Cheewatrakoolpong, Boonlert. et al. 2005. « Identification and Characterization of Splice Variants of the Human P2X7 ATP Channel ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332(1): 17-27.
- Chekeni, Faraaz B. et al. 2010. « Pannexin 1 Channels Mediate “find-Me” Signal Release and Membrane Permeability during Apoptosis ». *Nature* 467(7317): 863-67.
- Chen, Lanfen, et Celia F. Brosnan. 2006. « Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in P2X7R $^{-/-}$ Mice: Evidence for Loss of Apoptotic Activity in Lymphocytes1 ». *The Journal of Immunology* 176(5): 3115-26.
- Chen, X. et al. 2014. « Brilliant Blue G Improves Cognition in an Animal Model of Alzheimer’s Disease and Inhibits Amyloid- β -Induced Loss of Filopodia and Dendrite Spines in Hippocampal Neurons ». *Neuroscience* 279: 94-101.
- Chen, Yonghe. et al. 2018. « [Diagnostic value of P2X7 receptor and its role in inflammatory reaction in rheumatoid arthritis] ». *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 38(12): 1453-58.
- Chong, Jing-Hui et al. 2010. « The Hyposensitive N187D P2X7 Mutant Promotes Malignant Progression in Nude Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(46): 36179-87.
- Christy, Alison L., Margaret E. Walker, Martin J. Hessner, et Melissa A. Brown. 2013. « Mast Cell Activation and Neutrophil Recruitment Promotes Early and Robust Inflammation in the Meninges in EAE ». *Journal of Autoimmunity* 42: 50-61.

- Cohen, Jeffrey A et al. 2019. « Safety and Efficacy of Ozanimod versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis (RADIANCE): A Multicentre, Randomised, 24-Month, Phase 3 Trial ». *The Lancet Neurology* 18(11): 1021-33.
- Collo, G. et al. 1997. « Tissue Distribution of the P2X7 Receptor ». *Neuropharmacology* 36(9): 1277-83.
- Comi, Giancarlo et al. 2019. « Safety and Efficacy of Ozanimod versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis (SUNBEAM): A Multicentre, Randomised, Minimum 12-Month, Phase 3 Trial ». *The Lancet Neurology* 18(11): 1009-20.
- Comi, Giancarlo. et al. 2017. « Evolving Concepts in the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis ». *The Lancet* 389(10076): 1347-56.
- Compan, Vincent et al. 2012. « Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation ». *Immunity* 37(3): 487-500.
- Compston, A. 1988. « The 150th Anniversary of the First Depiction of the Lesions of Multiple Sclerosis ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 51(10): 1249-52.
- Cotrina, Maria Luisa, et Maiken Nedergaard. 2009. « Physiological and Pathological Functions of P2X7 Receptor in the Spinal Cord ». *Purinergic Signalling* 5(2): 223-32.
- Coull, Jeffrey A. M. et al. 2005. « BDNF from Microglia Causes the Shift in Neuronal Anion Gradient Underlying Neuropathic Pain ». *Nature* 438(7070): 1017-21.
- Coutinho-Silva, Robson et al. 1999. « P2Z/P2X7receptor-dependent apoptosis of dendritic cells ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 276(5): C1139-47.
- Coutinho-Silva, Robson et al. 2003. « Inhibition of Chlamydial Infectious Activity Due to P2X7R-Dependent Phospholipase D Activation ». *Immunity* 19(3): 403-12.
- Crotti, Andrea, et Richard M. Ransohoff. 2016. « Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-Wide Transcriptional Profiling ». *Immunity* 44(3): 505-15.
- Cruz, Cristiane M. et al. 2007. « ATP Activates a Reactive Oxygen Species-Dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages ». *The Journal of biological chemistry* 282(5): 2871.
- Dal Canto MC, null, B. S. Kim, S. D. Miller, et R. W. Melvold. 1996. « Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis ». *Methods (San Diego, Calif.)* 10(3): 453-61.
- Dang, Eric V. et al. 2011. « Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1 ». *Cell* 146(5): 772-84.
- Danquah, Welbeck et al. 2016. « Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation ». *Science Translational Medicine* 8(366): 366ra162-366ra162.
- De Genst, Erwin et al. 2006. « Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(12): 4586-91.
- De Jager, Philip L. et al. 2009. « Meta-Analysis of Genome Scans and Replication Identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as New Multiple Sclerosis Susceptibility Loci ». *Nature Genetics* 41(7): 776-82.

- De Marchi, Elena. et al. 2016. « Chapter Two - P2X7 Receptor as a Therapeutic Target ». In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Ion channels as therapeutic targets, part B, éd. Rossen Donev. Academic Press, 39-79. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876162315000929> (13 janvier 2023).
- De Salis, Sophie K. F. et al. 2022. « Alternatively Spliced Isoforms of the P2X7 Receptor: Structure, Function and Disease Associations ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(15): 8174.
- Delarasse, Cécile et al. 2009. « Neural Progenitor Cell Death Is Induced by Extracellular ATP via Ligation of P2X7 Receptor ». *Journal of Neurochemistry* 109(3): 846-57.
- Delarasse, Cécile et al. 2011. « The Purinergic Receptor P2X7 Triggers α -Secretase-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(4): 2596-2606.
- Dell'Antonio, Giacomo et al. 2002. « Relief of Inflammatory Pain in Rats by Local Use of the Selective P2X7 ATP Receptor Inhibitor, Oxidized ATP ». *Arthritis and Rheumatism* 46(12): 3378-85.
- Demeules, Mélanie et al. 2020. « Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using RAAV Vector and Nanobodies (AAVnano) ». *Frontiers in Oncology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01699/full> (15 juin 2021).
- Dendrou, Calliope . et al.2015. « Immunopathology of Multiple Sclerosis ». *Nature Reviews Immunology* 15(9): 545-58.
- Deplano, Simona et al. 2013. « P2X7 receptor-mediated Nlrp3-inflammasome activation is a genetic determinant of macrophage-dependent crescentic glomerulonephritis ». *Journal of Leukocyte Biology* 93(1): 127-34.
- Di Virgilio, Francesco. 2003. « Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target ». *British Journal of Pharmacology* 140(3): 441-43.
- Di Virgilio, Francesco. 2017. « The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation ». *Immunity* 47(1): 15-31.
- Ding, Shinghua, et Frederick Sachs. 1999. « Single Channel Properties of P2X2 Purinoceptors ». *Journal of General Physiology* 113(5): 695-720.
- Domercq, María, et C Matute. 2019. « Targeting P2X4 and P2X7 Receptors in Multiple Sclerosis ». *Current Opinion in Pharmacology* 47: 119-25.
- Dominguez-Villar, Margarita, Clare M. Baecher-Allan, et David A. Hafler. 2011. « Identification of T Helper Type 1-like, Foxp3+ Regulatory T Cells in Human Autoimmune Disease ». *Nature Medicine* 17(6): 673-75.
- Donnelly-Roberts, Diana L, Marian T Namovic, Ping Han, et Michael F Jarvis. 2009. « Mammalian P2X7 Receptor Pharmacology: Comparison of Recombinant Mouse, Rat and Human P2X7 Receptors ». *British Journal of Pharmacology* 157(7): 1203-14.
- Durrenberger, Pascal F. et al. 2012. « Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease; A BNE Microarray Study ». *Parkinson's Disease* 2012: e214714.

- Eichhoff, Anna Marei et al. 2019. « Nanobody-Enhanced Targeting of AAV Gene Therapy Vectors ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 15: 211-20.
- Elliott, James I, John H McVey, et Christopher F Higgins. 2005. « 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* 7(3): R468-75.
- Ellwardt, Erik. et al. 2016. « Understanding the Role of T Cells in CNS Homeostasis ». *Trends in Immunology* 37(2): 154-65.
- Elssner, Andreas et al. 2004. « A Novel P2X7 Receptor Activator, the Human Cathelicidin-Derived Peptide LL37, Induces IL-1 Beta Processing and Release ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172(8): 4987-94.
- Eser, Alexander et al. 2015. « Safety and Efficacy of an Oral Inhibitor of the Purinergic Receptor P2X7 in Adult Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-controlled, Double-blind, Phase IIa Study ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21(10): 2247-53.
- Eshaghi, Arman et al. 2018. « Progression of regional grey matter atrophy in multiple sclerosis ». *Brain* 141(6): 1665-77.
- Falzone, S. et al. 1995. « The Purinergic P2Z Receptor of Human Macrophage Cells. Characterization and Possible Physiological Role ». *The Journal of Clinical Investigation* 95(3): 1207-16.
- Fang, Tao et al. 2018. « Nanobody Immunostaining for Correlated Light and Electron Microscopy with Preservation of Ultrastructure ». *Nature Methods* 15(12): 1029-32.
- Feng, Ying-Hong et al. 2006. « A Truncated P2X7 Receptor Variant (P2X7-j) Endogenously Expressed in Cervical Cancer Cells Antagonizes the Full-Length P2X7 Receptor through Hetero-Oligomerization* ». *Journal of Biological Chemistry* 281(25): 17228-37.
- Ferrari, D. et al. 1999. « P2Z Purinoreceptor Ligation Induces Activation of Caspases with Distinct Roles in Apoptotic and Necrotic Alterations of Cell Death ». *FEBS letters* 447(1): 71-75.
- Ferrari, Davide et al. 1997. « ATP-Mediated Cytotoxicity in Microglial Cells ». *Neuropharmacology* 36(9): 1295-1301.
- Ferrari, Davide et al. 2004. « The Antibiotic Polymyxin B Modulates P2X7 Receptor Function1 ». *The Journal of Immunology* 173(7): 4652-60.
- Ferrazoli, Enéas G. et al. 2017. « Brilliant Blue G, but Not Fenofibrate, Treatment Reverts Hemiparkinsonian Behavior and Restores Dopamine Levels in an Animal Model of Parkinson's Disease ». *Cell Transplantation* 26(4): 669-77.
- Figliuolo, Vanessa R. et al. 2017. « P2X7 Receptor Promotes Intestinal Inflammation in Chemically Induced Colitis and Triggers Death of Mucosal Regulatory T Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863(6): 1183-94.
- Filippi, Massimo et al. 2018. « Multiple Sclerosis ». *Nature Reviews Disease Primers* 4(1): 1-27.
- Fletcher, J M et al. 2010. « T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis ». *Clinical and Experimental Immunology* 162(1): 1-11.

- Flotte, T R et al. 1993. « Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22): 10613-17.
- Franco, M., R. Bautista-Pérez, et O. Pérez-Méndez. 2015. « Purinergic Receptors in Tubulointerstitial Inflammatory Cells: A Pathophysiological Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension ». *Acta Physiologica* 214(1): 75-87.
- Franklin, Tina C., Chelsea Xu, et Ronald S. Duman. 2018. « Depression and Sterile Inflammation: Essential Role of Danger Associated Molecular Patterns ». *Brain, Behavior, and Immunity* 72: 2-13.
- Frischer, Josa M. et al. 2009. « The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains ». *Brain* 132(5): 1175-89.
- Frisullo, Giovanni et al. 2009. « Regulatory T Cells Fail to Suppress CD4T⁺-Bet⁺ T Cells in Relapsing Multiple Sclerosis Patients ». *Immunology* 127(3): 418-28.
- Fu, Ruying et al. 2014. « Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases ». *Molecular Neurobiology* 49(3): 1422-34.
- Furlan, Roberto, Carmela Cuomo, et Gianvito Martino. 2009. « Animal Models of Multiple Sclerosis ». In *Neural Cell Transplantation: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology™, éd. David Gordon et Neil J. Scolding. Totowa, NJ: Humana Press, 157-73. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-931-4_11 (1 septembre 2022).
- Gao, Guang-Ping et al. 2002. « Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(18): 11854-59.
- Garbers, Christoph et al. 2011. « Species Specificity of ADAM10 and ADAM17 Proteins in Interleukin-6 (IL-6) Trans-Signaling and Novel Role of ADAM10 in Inducible IL-6 Receptor Shedding* ». *Journal of Biological Chemistry* 286(17): 14804-11.
- Gentile, Daniela et al. 2017. « Searching Novel Therapeutic Targets for Scleroderma: P2X7-Receptor Is Up-regulated and Promotes a Fibrogenic Phenotype in Systemic Sclerosis Fibroblasts ». *Frontiers in Pharmacology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00638> (4 avril 2023).
- Gilbert, S. M. et al. 2019. « ATP in the Tumour Microenvironment Drives Expression of NfP2X7, a Key Mediator of Cancer Cell Survival ». *Oncogene* 38(2): 194-208.
- Giles, David A. et al. 2018. « CNS-Resident Classical DCs Play a Critical Role in CNS Autoimmune Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 128(12): 5322-34.
- Giuliani, Anna Lisa. et al. 2019. « Extracellular Nucleotides and Nucleosides as Signalling Molecules ». *Immunology Letters* 205: 16-24.
- Goldmann, Tobias et al. 2013. « A New Type of Microglia Gene Targeting Shows TAK1 to Be Pivotal in CNS Autoimmune Inflammation ». *Nature Neuroscience* 16(11): 1618-26.
- Gonçalves, R. G. et al. 2006. « The Role of Purinergic P2X7 Receptors in the Inflammation and Fibrosis of Unilateral Ureteral Obstruction in Mice ». *Kidney International* 70(9): 1599-1606.

- Granata, Simona et al. 2015. « NLRP3 Inflammasome Activation in Dialyzed Chronic Kidney Disease Patients ». *PLOS ONE* 10(3): e0122272.
- Grassi, Fabio, et Benedetta De Ponte Conti. 2021. « The P2X7 Receptor in Tumor Immunity ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.694831> (10 janvier 2023).
- Grimm, Dirk et al. 2006. « Liver Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus Is Primarily Restricted by Capsid Serotype Not Vector Genotype ». *Journal of Virology* 80(1): 426-39.
- Grimm, Dirk et al. 2008. « In Vitro and in Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses ». *Journal of Virology* 82(12): 5887-5911.
- Grimm, Dirk, Mark A. Kay, et Juergen A. Kleinschmidt. 2003. « Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-Associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 7(6): 839-50.
- Gross, Olaf. et al. 2011. « The Inflammasome: An Integrated View ». *Immunological Reviews* 243(1): 136-51.
- Grygorowicz, Tomasz et al. 2010. « Temporal Expression of P2X7 Purinergic Receptor during the Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Neurochemistry International* 57(7): 823-29.
- Grygorowicz, Tomasz. et al. 2018. « Administration of an antagonist of P2X7 receptor to EAE rats prevents a decrease of expression of claudin-5 in cerebral capillaries ». *Purinergic Signalling* 14(4): 385-93.
- Grygorowicz, Tomasz. et al. 2016. « Early P2X7R-Related Astroglialosis in Autoimmune Encephalomyelitis ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 74: 1-9.
- Gu, Ben J. et al. 2012. « P2X7 Receptor-mediated Scavenger Activity of Mononuclear Phagocytes toward Non-opsonized Particles and Apoptotic Cells Is Inhibited by Serum Glycoproteins but Remains Active in Cerebrospinal Fluid ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(21): 17318-30.
- Gu, Ben J. et al. 2013. « A Rare Functional Haplotype of the P2RX4 and P2RX7 Genes Leads to Loss of Innate Phagocytosis and Confers Increased Risk of Age-Related Macular Degeneration ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(4): 1479-87.
- Gu, Ben J. et al. 2015. « A rare P2X7 variant Arg307Gln with absent pore formation function protects against neuroinflammation in multiple sclerosis ». *Human Molecular Genetics* 24(19): 5644-54.
- Gu, Ben J. et al. 2010. « The P2X7-Nonmuscle Myosin Membrane Complex Regulates Phagocytosis of Nonopsonized Particles and Bacteria by a Pathway Attenuated by Extracellular ATP ». *Blood* 115(8): 1621-31.
- Gu, Ben J. et al. 2011. « P2X(7) Is a Scavenger Receptor for Apoptotic Cells in the Absence of Its Ligand, Extracellular ATP ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187(5): 2365-75.

- Gulbransen, Brian D. et al. 2012. « Activation of Neuronal P2X7 Receptor–Pannexin-1 Mediates Death of Enteric Neurons during Colitis ». *Nature Medicine* 18(4): 600-604.
- Guzman-Aranguez, Ana. et al. 2017. « Hyperosmotic Stress Induces ATP Release and Changes in P2X7 Receptor Levels in Human Corneal and Conjunctival Epithelial Cells ». *Purinergic Signalling* 13(2): 249-58.
- Haag, Friedrich et al. 2007. « Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation ». *Purinergic Signalling* 3(1-2): 71-81.
- Habbas, Samia, Fabrice Ango, Hervé Daniel, et Micaela Galante. 2011. « Purinergic Signaling in the Cerebellum: Bergmann Glial Cells Express Functional Ionotropic P2X7 Receptors ». *Glia* 59(12): 1800-1812.
- Hattori, Motoyuki, et Eric Gouaux. 2012. « Molecular Mechanism of ATP Binding and Ion Channel Activation in P2X Receptors ». *Nature* 485(7397): 207-12.
- Hauser, Stephen L., et Bruce A. C. Cree. 2020a. « Treatment of Multiple Sclerosis: A Review ». *The American Journal of Medicine* 133(12): 1380-1390.e2.
- He, Yingbo. et al. 2017. « The role of microglial P2X7: modulation of cell death and cytokine release ». *Journal of Neuroinflammation* 14(1): 135.
- Helliwell, R M et al. 2015. « Selected Ginsenosides of the Protopanaxdiol Series Are Novel Positive Allosteric Modulators of P2X7 Receptors ». *British Journal of Pharmacology* 172(13): 3326-40.
- Heneka, Michael T., Markus P. Kummer, et Eicke Latz. 2014. « Innate Immune Activation in Neurodegenerative Disease ». *Nature Reviews Immunology* 14(7): 463-77.
- Herz, Jasmin et al. 2017. « Myeloid Cells in the Central Nervous System ». *Immunity* 46(6): 943-56.
- Hewinson, J., et A. B. Mackenzie. 2007. « P2X(7) Receptor-Mediated Reactive Oxygen and Nitrogen Species Formation: From Receptor to Generators ». *Biochemical Society Transactions* 35(Pt 5): 1168-70.
- Hibell, A D et al. 2000. « Apparent species differences in the kinetic properties of P2X7 receptors ». *British Journal of Pharmacology* 130(1): 167-73.
- Ho, Pei-Ran et al. 2017. « Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients with Multiple Sclerosis: A Retrospective Analysis of Data from Four Clinical Studies ». *The Lancet Neurology* 16(11): 925-33.
- Hofman, Paul et al. 2015. « Genetic and Pharmacological Inactivation of the Purinergic P2RX7 Receptor Dampens Inflammation but Increases Tumor Incidence in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer ». *Cancer Research* 75(5): 835-45.
- Hoggan, M D, N R Blacklow, et W P Rowe. 1966. « Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55(6): 1467-74.
- Homolya, L. et al. 2000. « Cell to Cell Communication in Response to Mechanical Stress via Bilateral Release of ATP and UTP in Polarized Epithelia ». *The Journal of Cell Biology* 150(6): 1349-60.

- Horváth, Gergely et al. 2019. « P2X7 Receptors Drive Poly(I:C) Induced Autism-like Behavior in Mice ». *The Journal of Neuroscience* 39(13): 2542-61.
- Hracskó, Zsuzsanna et al. 2011. « Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease ». *Molecular Neurodegeneration* 6(1): 28.
- Hu, Huiling et al. 2010. « Stimulation of the P2X7 Receptor Kills Rat Retinal Ganglion Cells in Vivo ». *Experimental Eye Research* 91(3): 425-32.
- Huang, Yubin et al. 2018. « Repopulated Microglia Are Solely Derived from the Proliferation of Residual Microglia after Acute Depletion ». *Nature Neuroscience* 21(4): 530-40.
- Huber, Magdalena et al. 2013. « IL-17A Secretion by CD8⁺ T Cells Supports Th17-Mediated Autoimmune Encephalomyelitis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123(1): 247-60.
- Huo, Hong et al. 2018. « Mapping the binding site of the P2X receptor antagonist PPADS reveals the importance of orthosteric site charge and the cysteine-rich head region ». *The Journal of Biological Chemistry* 293(33): 12820-31.
- iMSMS Consortium. Electronic address: sergio.baranzini@ucsf.edu et iMSMS Consortium. 2022. « Gut Microbiome of Multiple Sclerosis Patients and Paired Household Healthy Controls Reveal Associations with Disease Risk and Course ». *Cell* 185(19): 3467-3486.e16.
- Ingram, Jessica R. et al. 2018. « Exploiting Nanobodies' Singular Traits ». *Annual Review of Immunology* 36: 695-715.
- Inojosa, Hernan. et al. 2020. « Clinical Outcome Measures in Multiple Sclerosis: A Review ». *Autoimmunity Reviews* 19(5): 102512.
- Inoue, Kazuhide, et Makoto Tsuda. 2021. « Nociceptive Signaling Mediated by P2X3, P2X4 and P2X7 Receptors ». *Biochemical Pharmacology* 187: 114309.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al. 2007. « Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study ». *The New England Journal of Medicine* 357(9): 851-62.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al. 2011. « Genetic Risk and a Primary Role for Cell-Mediated Immune Mechanisms in Multiple Sclerosis ». *Nature* 476(7359): 214-19.
- International multiple sclerosis genetics consortium. 2019. « Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility ». *Science* 365(6460): eaav7188.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Electronic address: chris.cotsapas@yale.edu et International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. 2018. « Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk ». *Cell* 175(6): 1679-1687.e7.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al. 2013. « Analysis of Immune-Related Loci Identifies 48 New Susceptibility Variants for Multiple Sclerosis ». *Nature Genetics* 45(11): 1353-60.
- Jacobson, Kenneth A., et Christa E. Müller. 2016. « Medicinal Chemistry of Adenosine, P2Y and P2X Receptors ». *Neuropharmacology* 104: 31-49.

- Jelcic, Ivan et al. 2018. « Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis ». *Cell* 175(1): 85-100.e23.
- Jiang, Lin-Hua et al. 2003. « Subunit Arrangement in P2X Receptors ». *Journal of Neuroscience* 23(26): 8903-10.
- Jiang, Lin-Hua, Emily A. Caseley, Steve P. Muench, et Sébastien Roger. 2021. « Structural Basis for the Functional Properties of the P2X7 Receptor for Extracellular ATP ». *Purinergic Signalling* 17(3): 331-44.
- Jiang, Lin-Hua, Amanda B. Mackenzie, R. Alan North, et Annmarie Surprenant. 2000. « Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors ». *Molecular Pharmacology* 58(1): 82-88.
- Jiang, Tianfang et al. 2015. « P2X7 Receptor Is Critical in α -Synuclein–Mediated Microglial NADPH Oxidase Activation ». *Neurobiology of Aging* 36(7): 2304-18.
- Jimenez-Pacheco, Alba et al. 2016. « Transient P2X7 Receptor Antagonism Produces Lasting Reductions in Spontaneous Seizures and Gliosis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy ». *Journal of Neuroscience* 36(22): 5920-32.
- Kaczmarek-Hajek, Karina et al. 2018. « Re-Evaluation of Neuronal P2X7 Expression Using Novel Mouse Models and a P2X7-Specific Nanobody ». *eLife* 7: e36217.
- Kahlenberg, J. Michelle et al. 2005. « Potentiation of Caspase-1 Activation by the P2X7 Receptor Is Dependent on TLR Signals and Requires NF-KappaB-Driven Protein Synthesis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175(11): 7611-22.
- Kanellopoulos, Jean M., et Cécile Delarasse. 2019. « Pleiotropic Roles of P2X7 in the Central Nervous System ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00401> (16 janvier 2023).
- Kappos, Ludwig et al. 2014. « Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis: An Integrated Analysis of Safety Findings ». *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 3(4): 494-504.
- Karasawa, Akira, et Toshimitsu Kawate. 2016. « Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor » éd. Kenton J Swartz. *eLife* 5: e22153.
- Kawate, Toshimitsu. 2017. « P2X Receptor Activation ». In *Protein Reviews: Volume 19, Advances in Experimental Medicine and Biology*, éd. M. Zouhair Atassi. Singapore: Springer, 55-69. https://doi.org/10.1007/5584_2017_55 (2 novembre 2022).
- Kebir, Hania et al. 2009. « Preferential Recruitment of Interferon- γ -Expressing TH17 Cells in Multiple Sclerosis ». *Annals of Neurology* 66(3): 390-402.
- Keystone, Edward C. et al. 2012. « Clinical Evaluation of the Efficacy of the P2X7 Purinergic Receptor Antagonist AZD9056 on the Signs and Symptoms of Rheumatoid Arthritis in Patients with Active Disease despite Treatment with Methotrexate or Sulphasalazine ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 71(10): 1630-35.
- Kido, Yuuka et al. 2014. « Regulation of Activity of P2X7 Receptor by Its Splice Variants in Cultured Mouse Astrocytes ». *Glia* 62(3): 440-51.

- Kieseier, Bernd C. 2011. « The Mechanism of Action of Interferon- β in Relapsing Multiple Sclerosis ». *CNS Drugs* 25(6): 491-502.
- Killeen, Meaghan E. et al. 2013. « Signaling through Purinergic Receptors for ATP Induces Human Cutaneous Innate and Adaptive Th17 Responses: Implications in the Pathogenesis of Psoriasis ». *The Journal of Immunology* 190(8): 4324-36.
- Kim, Miran et al. 2001. « Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex ». *The EMBO Journal* 20(22): 6347-58.
- Kipnis, Jonathan. 2016. « Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system ». *Science* 353(6301): 766-71.
- Kipp, Markus, et al. 2017. « Multiple Sclerosis Animal Models: A Clinical and Histopathological Perspective ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 27(2): 123-37.
- Kira, Jun-ichi. 2008. « Neuromyelitis Optica and Asian Phenotype of Multiple Sclerosis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1142(1): 58-71.
- Koch-Nolte, Friedrich et al. 2019. « Novel Biologics Targeting the P2X7 Ion Channel ». *Current Opinion in Pharmacology* 47: 110-18.
- Koo, Tai Yeon et al. 2017. « The P2X7 Receptor Antagonist, Oxidized Adenosine Triphosphate, Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Expansion of Regulatory T Cells ». *Kidney International* 92(2): 415-31.
- Kouwenhoven, M. et al. 2001. « Monocytes in Multiple Sclerosis: Phenotype and Cytokine Profile ». *Journal of Neuroimmunology* 112(1-2): 197-205.
- Kumar, Saket, et al. 2017. « Purinergic Antagonism Prevents Mitochondrial Dysfunction and Behavioral Deficits Associated with Dopaminergic Toxicity Induced by 6-OHDA in Rats ». *Neurochemical Research* 42(12): 3414-30.
- Kunis, Gilad et al. 2013. « IFN- γ -dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair ». *Brain* 136(11): 3427-40.
- Kunis, Gilad et al. 2015. « Immunization with a Myelin-Derived Antigen Activates the Brain's Choroid Plexus for Recruitment of Immunoregulatory Cells to the CNS and Attenuates Disease Progression in a Mouse Model of ALS ». *The Journal of Neuroscience* 35(16): 6381-93.
- Kunkl, Martina et al. 2020. « T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis ». *Cells* 9(2): 482.
- Kurashima, Yosuke et al. 2012. « Extracellular ATP Mediates Mast Cell-Dependent Intestinal Inflammation through P2X7 Purinoceptors ». *Nature Communications* 3(1): 1034.
- Labasi, Jeffrey M. et al. 2002. « Absence of the P2X7 Receptor Alters Leukocyte Function and Attenuates an Inflammatory Response ». *The Journal of Immunology* 168(12): 6436-45.
- Lalive, Patrice H. et al. 2011. « Glatiramer Acetate in the Treatment of Multiple Sclerosis ». *CNS drugs* 25(5): 401-14.

- van Langelaar, Jamie et al. 2018. « T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention ». *Brain* 141(5): 1334-49.
- Lanz, Tobias V. et al. 2022. « Clonally Expanded B Cells in Multiple Sclerosis Bind EBV EBNA1 and GlialCAM ». *Nature* 603(7900): 321-27.
- Lazarowski, Eduardo R. et al. 2011. « Chapter 8 - Molecular Mechanisms of Purine and Pyrimidine Nucleotide Release ». In *Advances in Pharmacology, Pharmacology of Purine and Pyrimidine Receptors*, éd. Kenneth A. Jacobson et Joel Linden. Academic Press, 221-61. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123855268000084> (13 janvier 2023).
- Lee, Ga Eun et al. 2008. « Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of Tyrosine-Based Antagonists at the Human P2X7 Receptor ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18(2): 571-75.
- Leeson, Hannah C. et al. 2018. « P2X7 Receptors Regulate Phagocytosis and Proliferation in Adult Hippocampal and SVZ Neural Progenitor Cells: Implications for Inflammation in Neurogenesis ». *Stem Cells* 36(11): 1764-77.
- Lenertz, Lisa Y., Monica L. Gavala, Lindsay M. Hill, et Paul J. Bertics. 2009. « Cell Signaling via the P2X(7) Nucleotide Receptor: Linkage to ROS Production, Gene Transcription, and Receptor Trafficking ». *Purinergic Signalling* 5(2): 175-87.
- Leray, E., T. Moreau, A. Fromont, et G. Edan. 2016. « Epidemiology of Multiple Sclerosis ». *Revue Neurologique* 172(1): 3-13.
- Lester, Susan et al. 2013. « Epistasis with HLA DR3 Implicates the P2X7 Receptor in the Pathogenesis of Primary Sjögren's Syndrome ». *Arthritis Research & Therapy* 15(4): R71.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, et Sussan Nourshargh. 2007. « Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated ». *Nature Reviews Immunology* 7(9): 678-89.
- Li, Rui et al. 2015. « Proinflammatory GM-CSF–producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy ». *Science Translational Medicine* 7(310): 310ra166-310ra166.
- Li, Rui et al. 2017. « Antibody-Independent Function of Human B Cells Contributes to Antifungal T Cell Responses ». *The Journal of Immunology* 198(8): 3245-54.
- Li, Rui, Kristina R. Patterson, et Amit Bar-Or. 2018. « Reassessing B Cell Contributions in Multiple Sclerosis ». *Nature Immunology* 19(7): 696-707.
- Li, Wuping et al. 2009. « Generation of Novel AAV Variants by Directed Evolution for Improved CFTR Delivery to Human Ciliated Airway Epithelium ». *Molecular Therapy* 17(12): 2067-77.
- Liddelov, Shane A. et al. 2017. « Neurotoxic Reactive Astrocytes Are Induced by Activated Microglia ». *Nature* 541(7638): 481-87.
- Lin, Changwei et al. 2012. « Extracellular ATP Induces CD44 Shedding from Macrophage-like P388D1 Cells via the P2X7 Receptor ». *Hematological Oncology* 30(2): 70-75.

- van der Linden, R. H. et al. 1999. « Comparison of Physical Chemical Properties of Llama VHH Antibody Fragments and Mouse Monoclonal Antibodies ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1431(1): 37-46.
- Lisak, Robert P. et al. 2017. « B Cells from Patients with Multiple Sclerosis Induce Cell Death via Apoptosis in Neurons in Vitro ». *Journal of Neuroimmunology* 309: 88-99.
- Liu, Xing et al. 2008. « Identification of Key Residues Coordinating Functional Inhibition of P2X7 Receptors by Zinc and Copper ». *Molecular Pharmacology* 73(1): 252-59.
- Liu, Yanhui, Yajuan Xiao, et Zhiyuan Li. 2011. « P2X7 Receptor Positively Regulates MyD88-Dependent NF-KB Activation ». *Cytokine* 55(2): 229-36.
- Locatelli, Giuseppe et al. 2018. « Mononuclear Phagocytes Locally Specify and Adapt Their Phenotype in a Multiple Sclerosis Model ». *Nature Neuroscience* 21(9): 1196-1208.
- Longhi, Maria Serena, Alan Moss, Zhenghui Gordon Jiang, et Simon C. Robson. 2017. « Purinergic Signaling during Intestinal Inflammation ». *Journal of Molecular Medicine* 95(9): 915-25.
- Lopez-Castejon, Gloria et al. 2010. « P2X7 Receptor-Mediated Release of Cathepsins from Macrophages Is a Cytokine-Independent Mechanism Potentially Involved in Joint Diseases ». *The Journal of Immunology* 185(4): 2611-19.
- Louveau, Antoine et al. 2015. « Structural and Functional Features of Central Nervous System Lymphatic Vessels ». *Nature* 523(7560): 337-41.
- Louveau, Antoine, Sandro Da Mesquita, et Jonathan Kipnis. 2016. « Lymphatics in Neurological Disorders: A Neuro-Lympho-Vascular Component of Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease? » *Neuron* 91(5): 957-73.
- Lovelace, Michael D. et al. 2015. « P2X7 Receptors Mediate Innate Phagocytosis by Human Neural Precursor Cells and Neuroblasts ». *STEM CELLS* 33(2): 526-41.
- Lucca, Liliana E. et al. 2019. « TIGIT Signaling Restores Suppressor Function of Th1 Tregs ». *JCI Insight* 4(3). <https://insight.jci.org/articles/view/124427> (17 mai 2023).
- Ludwin, S. K. 1978. « Central Nervous System Demyelination and Remyelination in the Mouse: An Ultrastructural Study of Cuprizone Toxicity ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 39(6): 597-612.
- Lünemann, Jan D. et al. 2008. « EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN- γ and IL-2 ». *The Journal of Experimental Medicine* 205(8): 1763-73.
- Machado-Santos, Joana et al. 2018. « The Compartmentalized Inflammatory Response in the Multiple Sclerosis Brain Is Composed of Tissue-Resident CD8+ T Lymphocytes and B Cells ». *Brain: A Journal of Neurology* 141(7): 2066-82.
- Mackenzie, Amanda B., Mark T. Young, Elena Adinolfi, et Annmarie Surprenant. 2005. « Pseudoapoptosis Induced by Brief Activation of ATP-Gated P2X7 Receptors * ». *Journal of Biological Chemistry* 280(40): 33968-76.

- Makhlouf, Karim, Howard L Weiner, et Samia J Khoury. 2001. « Increased Percentage of IL-12+ Monocytes in the Blood Correlates with the Presence of Active MRI Lesions in MS ». *Journal of Neuroimmunology* 119(1): 145-49.
- Malmeström, Clas et al. 2008. « Relapses in Multiple Sclerosis Are Associated with Increased CD8+ T-Cell Mediated Cytotoxicity in CSF ». *Journal of Neuroimmunology* 196(1): 159-65.
- Marcellino, Daniel et al. 2010. « On the Role of P2X7 Receptors in Dopamine Nerve Cell Degeneration in a Rat Model of Parkinson's Disease: Studies with the P2X7 Receptor Antagonist A-438079 ». *Journal of Neural Transmission* 117(6): 681-87.
- Marques, Carla Caldas et al. 2014. « Prophylactic Systemic P2X7 Receptor Blockade Prevents Experimental Colitis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842(1): 65-78.
- Martin, Elodie et al. 2019. « New Role of P2X7 Receptor in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Molecular Psychiatry* 24(1): 108-25.
- Martínez-Cuesta, María Ángeles et al. 2020a. « Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 8454.
- Mascanfroni, Ivan D. et al. 2015. « Metabolic Control of Type 1 Regulatory T Cell Differentiation by AHR and HIF1- α ». *Nature Medicine* 21(6): 638-46.
- Masin, Marianela et al. 2012. « Expression, Assembly and Function of Novel C-Terminal Truncated Variants of the Mouse P2X7 Receptor: Re-Evaluation of P2X7 Knockouts ». *British Journal of Pharmacology* 165(4): 978-93.
- Matsukawa, Toshihiro et al. 2016. « Ceramide-CD300f Binding Suppresses Experimental Colitis by Inhibiting ATP-Mediated Mast Cell Activation ». *Gut* 65(5): 777-87.
- Matute, Carlos et al. 2007. « P2X7 Receptor Blockade Prevents ATP Excitotoxicity in Oligodendrocytes and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Neuroscience* 27(35): 9525-33.
- McCarthy, Alanna E., Craig Yoshioka, et Steven E. Mansoor. 2019. « Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization ». *Cell* 179(3): 659-670.e13.
- McGavern, D. B. et al. 2000. « Axonal Loss Results in Spinal Cord Atrophy, Electrophysiological Abnormalities and Neurological Deficits Following Demyelination in a Chronic Inflammatory Model of Multiple Sclerosis ». *Brain: A Journal of Neurology* 123 Pt 3(Pt 3): 519-31.
- McLarnon, James G., Jae K. Ryu, Douglas G. Walker, et Hyun B. Choi. 2006. « Upregulated Expression of Purinergic P2X7 Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid- β Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65(11): 1090-97.
- McNamara, N. et al. 2001. « ATP Transduces Signals from ASGM1, a Glycolipid That Functions as a Bacterial Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16): 9086-91.

- McQuillin, A. et al. 2009. « Case–Control Studies Show That a Non-Conservative Amino-Acid Change from a Glutamine to Arginine in the P2RX7 Purinergic Receptor Protein Is Associated with Both Bipolar- and Unipolar-Affective Disorders ». *Molecular Psychiatry* 14(6): 614-20.
- Medaer, R. 1979. « Does the History of Multiple Sclerosis Go Back as Far as the 14th Century? » *Acta Neurologica Scandinavica* 60(3): 189-92.
- Medawar, P. B. 1948. « Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye ». *British Journal of Experimental Pathology* 29(1): 58.
- Melani, Alessia et al. 2006. « P2X7 Receptor Modulation on Microglial Cells and Reduction of Brain Infarct Caused by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rat ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26(7): 974-82.
- Melzer, Nico, Sven G. Meuth, et Heinz Wiendl. 2009. « CD8+ T Cells and Neuronal Damage: Direct and Collateral Mechanisms of Cytotoxicity and Impaired Electrical Excitability ». *The FASEB Journal* 23(11): 3659-73.
- Menzies, Robert I., Frederick W. Tam, Robert J. Unwin, et Matthew A. Bailey. 2017. « Purinergic Signaling in Kidney Disease ». *Kidney International* 91(2): 315-23.
- Messemer, Nanette et al. 2013. « P2X7 Receptors at Adult Neural Progenitor Cells of the Mouse Subventricular Zone ». *Neuropharmacology* 73: 122-37.
- Metzger, Michael W., Sandra M. Walser, Fernando Aprile-Garcia, et al. 2017. « Genetically Dissecting P2rx7 Expression within the Central Nervous System Using Conditional Humanized Mice ». *Purinergic Signalling* 13(2): 153-70.
- Metzger, Michael W., Sandra M. Walser, Nina Dedic, et al. 2017. « Heterozygosity for the Mood Disorder-Associated Variant Gln460Arg Alters P2X7 Receptor Function and Sleep Quality ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37(48): 11688-700.
- Mishra, Amarjit et al. 2016. « A Critical Role for P2X7 Receptor–Induced VCAM-1 Shedding and Neutrophil Infiltration during Acute Lung Injury ». *The Journal of Immunology* 197(7): 2828-37.
- Mix, Eilhard, Hans Meyer-Rienecker, Hans-Peter Hartung, et Uwe K. Zettl. 2010. « Animal Models of Multiple Sclerosis—Potentials and Limitations ». *Progress in Neurobiology* 92(3): 386-404.
- Möller, Sina et al. 2007. « Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation ». *Purinergic Signalling* 3(4): 359-66.
- Monif, Mastura et al. 2009. « The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29(12): 3781-91.
- Monson, Nancy L. et al. 2005. « Effect of Rituximab on the Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid B Cells in Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis ». *Archives of Neurology* 62(2): 258-64.

- Montalban, X. et al. 2018. « ECTRIMS/EAN Guideline on the Pharmacological Treatment of People with Multiple Sclerosis ». *European Journal of Neurology* 25(2): 215-37.
- Moon, Hana, Hye-Young Na, Kyung Hee Chong, et Tae Jin Kim. 2006. « P2X7 Receptor-Dependent ATP-Induced Shedding of CD27 in Mouse Lymphocytes ». *Immunology Letters* 102(1): 98-105.
- Moore, Samantha F., et Amanda B. MacKenzie. 2008. « Species and Agonist Dependent Zinc Modulation of Endogenous and Recombinant ATP-Gated P2X7 Receptors ». *Biochemical Pharmacology* 76(12): 1740-47.
- Muñoz-Planillo, Raúl et al. 2013. « K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter ». *Immunity* 38(6): 1142-53.
- Murphy, Aine C., Stephen J. Lalor, Marina A. Lynch, et Kingston H. G. Mills. 2010. « Infiltration of Th1 and Th17 Cells and Activation of Microglia in the CNS during the Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Brain, Behavior, and Immunity* 24(4): 641-51.
- Muyldermans, Serge. 2013. « Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies ». *Annual Review of Biochemistry* 82: 775-97.
- Namer, I. J. et al. 1994. « The Role of Mycobacterium Tuberculosis in Experimental Allergic Encephalomyelitis ». *European Neurology* 34(4): 224-27.
- Narcisse, Leontine et al. 2005. « The Cytokine IL-1 β Transiently Enhances P2X7 Receptor Expression and Function in Human Astrocytes ». *Glia* 49(2): 245-58.
- Neves, Adriane R. et al. 2014. « Overexpression of ATP-Activated P2X7 Receptors in the Intestinal Mucosa Is Implicated in the Pathogenesis of Crohn's Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 20(3): 444-57.
- Ni, Jiong et al. 2013. « Silencing of the P2X(7) Receptor Enhances Amyloid- β Phagocytosis by Microglia ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434(2): 363-69.
- Nicke, Annette. 2008. « Homotrimeric Complexes Are the Dominant Assembly State of Native P2X7 Subunits ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377(3): 803-8.
- Nicke, Annette. 2009. « A Functional P2X7 Splice Variant with an Alternative Transmembrane Domain 1 Escapes Gene Inactivation in P2X7 Knock-out Mice* ». *Journal of Biological Chemistry* 284(38): 25813-22.
- Niewoehner, Jens et al. 2014. « Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Shuttle ». *Neuron* 81(1): 49-60.
- van Noort, J. M., J. J. Bajramovic, A. C. Plomp, et M. J. van Stipdonk. 2000. « Mistaken Self, a Novel Model That Links Microbial Infections with Myelin-Directed Autoimmunity in Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 105(1): 46-57.
- O'Connor, Paul et al. 2011. « Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis ». *New England Journal of Medicine* 365(14): 1293-1303.
- Ohlendorff, Stine D. et al. 2007. « Single Nucleotide Polymorphisms in the P2X7 Gene Are Associated to Fracture Risk and to Effect of Estrogen Treatment ». *Pharmacogenetics and Genomics* 17(7): 555-67.

- Ontaneda, Daniel, Alan J Thompson, Robert J Fox, et Jeffrey A Cohen. 2017. « Progressive Multiple Sclerosis: Prospects for Disease Therapy, Repair, and Restoration of Function ». *The Lancet* 389(10076): 1357-66.
- Oyanguren-Desez, Olatz et al. 2011. « Gain-of-Function of P2X7 Receptor Gene Variants in Multiple Sclerosis ». *Cell Calcium* 50(5): 468-72.
- Pan, Hui et al. 2016. « P2RX7-V3 Is a Novel Oncogene That Promotes Tumorigenesis in Uveal Melanoma ». *Tumor Biology* 37(10): 13533-43.
- Panenka, William et al. 2001. « P2X7-Like Receptor Activation in Astrocytes Increases Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression via Mitogen-Activated Protein Kinase ». *Journal of Neuroscience* 21(18): 7135-42.
- Panitch, HillelS., AndreaS. Haley, RobertL. Hirsch, et KennethP. Johnson. 1987. « EXACERBATIONS OF MULTIPLE SCLEROSIS IN PATIENTS TREATED WITH GAMMA INTERFERON ». *The Lancet* 329(8538): 893-95.
- Panupinthu, Nattapon et al. 2008. « P2X7 Receptors on Osteoblasts Couple to Production of Lysophosphatidic Acid: A Signaling Axis Promoting Osteogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 181(5): 859-71.
- Parvathenani, Lav K. et al. 2003a. « P2X7 Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-Regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease* ». *Journal of Biological Chemistry* 278(15): 13309-17.
- Pegoraro, Anna, Elena De Marchi, et Elena Adinolfi. 2021. « P2X7 Variants in Oncogenesis ». *Cells* 10(1): 189.
- Peng, Chao, John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. 2020. « Protein Transmission in Neurodegenerative Disease ». *Nature Reviews Neurology* 16(4): 199-212.
- Pettas, Spyros et al. 2022. « Profiling Microglia through Single-Cell RNA Sequencing over the Course of Development, Aging, and Disease ». *Cells* 11(15): 2383.
- Piccini, Alessandra et al. 2008. « ATP Is Released by Monocytes Stimulated with Pathogen-Sensing Receptor Ligands and Induces IL-1beta and IL-18 Secretion in an Autocrine Way ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(23): 8067-72.
- Pinto-Espinoza, Carolina et al. 2022. « Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs ». *Frontiers in Pharmacology* 13: 1029236.
- Pirko, Istvan et al. 2009. « Deep Gray Matter T2 Hypointensity Correlates with Disability in a Murine Model of MS ». *Journal of the Neurological Sciences* 282(1-2): 34-38.
- Polanco, Juan Carlos et al. 2018. « Amyloid- β and Tau Complexity - towards Improved Biomarkers and Targeted Therapies ». *Nature Reviews. Neurology* 14(1): 22-39.
- Prinz, Marco et al. 2008. « Distinct and Nonredundant In Vivo Functions of IFNAR on Myeloid Cells Limit Autoimmunity in the Central Nervous System ». *Immunity* 28(5): 675-86.

- Pupovac, Aleta, Christopher M. Foster, et Ronald Sluyter. 2013. « Human P2X7 Receptor Activation Induces the Rapid Shedding of CXCL16 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432(4): 626-31.
- Pupovac, Aleta, Nicholas J Geraghty, Debbie Watson, et Ronald Sluyter. 2015. « Activation of the P2X7 Receptor Induces the Rapid Shedding of CD23 from Human and Murine B Cells ». *Immunology & Cell Biology* 93(1): 77-85.
- Rabinowitz, Joseph E. et al. 2002. « Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity ». *Journal of Virology* 76(2): 791-801.
- Rae-Grant, Alexander et al. 2018. « Practice Guideline Recommendations Summary: Disease-Modifying Therapies for Adults with Multiple Sclerosis: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology ». *Neurology* 90(17): 777-88.
- Ramagopalan, Sreeram V, Ruth Dobson, Ute C Meier, et Gavin Giovannoni. 2010. « Multiple Sclerosis: Risk Factors, Prodromes, and Potential Causal Pathways ». *The Lancet Neurology* 9(7): 727-39.
- Rigato, Chiara et al. 2012. « Microglia Proliferation Is Controlled by P2X7 Receptors in a Pannexin-1-Independent Manner during Early Embryonic Spinal Cord Invasion ». *Journal of Neuroscience* 32(34): 11559-73.
- Rivas-Yáñez, Elizabeth et al. 2020. « P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(14): 4937.
- Rivers, T. M., D. H. Sprunt, et G. P. Berry. 1933. « OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS ». *The Journal of Experimental Medicine* 58(1): 39-53.
- Roger, Sébastien et al. 2010. « Single Nucleotide Polymorphisms That Were Identified in Affective Mood Disorders Affect ATP-Activated P2X7 Receptor Functions ». *Journal of Psychiatric Research* 44(6): 347-55.
- Roger, Sébastien, Pablo Pelegrin, et Annmarie Surprenant. 2008. « Facilitation of P2X7 Receptor Currents and Membrane Blebbing via Constitutive and Dynamic Calmodulin Binding ». *The Journal of Neuroscience* 28(25): 6393-6401.
- Romagnoli, Romeo et al. 2008. « The P2X7 receptor as a therapeutic target ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12(5): 647-61.
- Rudick, Richard A. et al. 2006. « Natalizumab plus Interferon Beta-1a for Relapsing Multiple Sclerosis ». *New England Journal of Medicine* 354(9): 911-23.
- Ruprecht, Klemens. 2020. « The role of Epstein-Barr virus in the etiology of multiple sclerosis: a current review ». *Expert Review of Clinical Immunology* 16(12): 1143-57.
- Russi, Abigail E. et al. 2016. « Meningeal Mast Cell-T Cell Crosstalk Regulates T Cell Encephalitogenicity ». *Journal of Autoimmunity* 73: 100-110.

- Rüther, Bernhard Josef et al. 2017. « Combination of Cuprizone and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to Study Inflammatory Brain Lesion Formation and Progression ». *Glia* 65(12): 1900-1913.
- Saber, Sameh et al. 2021. « BBG Enhances OLT1177-Induced NLRP3 Inflammasome Inactivation by Targeting P2X7R/NLRP3 and MyD88/NF-KB Signaling in DSS-Induced Colitis in Rats ». *Life Sciences* 270: 119123.
- Sadovnick, A Dessa et al. 2017. « Purinergic receptors P2RX4 and P2RX7 in familial multiple sclerosis ». *Human Mutation* 38(6): 736-44.
- Sage, Peter T. et al. 2018. « Dendritic Cell PD-L1 Limits Autoimmunity and Follicular T Cell Differentiation and Function ». *The Journal of Immunology* 200(8): 2592-2602.
- Samulski, R. J. et al. 1991. « Targeted Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) into Human Chromosome 19 ». *The EMBO journal* 10(12): 3941-50.
- Sánchez-Nogueiro, Jesús, Patricia Marín-García, et M. Teresa Miras-Portugal. 2005. « Characterization of a Functional P2X7-like Receptor in Cerebellar Granule Neurons from P2X7 Knockout Mice ». *FEBS Letters* 579(17): 3783-88.
- Sanmarco, Liliana M., Carolina M. Polonio, Michael A. Wheeler, et Francisco J. Quintana. 2021. « Functional immune cell–astrocyte interactions ». *Journal of Experimental Medicine* 218(9): e20202715.
- Santiago-Ortiz, Jorge L., et David V. Schaffer. 2016. « Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy ». *Journal of Controlled Release* 240: 287-301.
- Sanz, Juana M. et al. 2009. « Activation of Microglia by Amyloid {beta} Requires P2X7 Receptor Expression ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182(7): 4378-85.
- Sanz, Juana M, Paola Chiozzi, et Francesco Di Virgilio. 1998. « Tenidap Enhances P2Z/P2X7 Receptor Signalling in Macrophages ». *European Journal of Pharmacology* 355(2): 235-44.
- Sanz, Juana M., et Francesco Di Virgilio. 2000. « Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 β Release from Microglial Cells1 ». *The Journal of Immunology* 164(9): 4893-98.
- Savio, Luiz E. B., Paola de Andrade Mello, Cleide Gonçalves da Silva, et Robson Coutinho-Silva. 2018. « The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? » *Frontiers in Pharmacology* 9: 52.
- Sawcer, Stephen et al. 2011. « Genetic Risk and a Primary Role for Cell-Mediated Immune Mechanisms in Multiple Sclerosis ». *Nature* 476(7359): 214-19.
- Schafflick, David et al. 2020. « Integrated Single Cell Analysis of Blood and Cerebrospinal Fluid Leukocytes in Multiple Sclerosis ». *Nature Communications* 11(1): 1-14.
- Schattling, Benjamin et al. 2019. « Bassoon Proteinopathy Drives Neurodegeneration in Multiple Sclerosis ». *Nature Neuroscience* 22(6): 887-96.
- Scheld, Miriam et al. 2016. « Neurodegeneration Triggers Peripheral Immune Cell Recruitment into the Forebrain ». *Journal of Neuroscience* 36(4): 1410-15.

- Schenk, Ursula et al. 2011. « ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors ». *Science Signaling* 4(162): ra12-ra12.
- Scheuplein, Felix et al. 2009. « NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells¹ ». *The Journal of Immunology* 182(5): 2898-2908.
- Schwarz, Nicole et al. 2012. « Alternative Splicing of the N-Terminal Cytosolic and Transmembrane Domains of P2X7 Controls Gating of the Ion Channel by ADP-Ribosylation ». *PLOS ONE* 7(7): e41269.
- Secor, Virginia H., W. Evan Secor, Claire-Anne Gutekunst, et Melissa A. Brown. 2000. « Mast Cells Are Essential for Early Onset and Severe Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis ». *Journal of Experimental Medicine* 191(5): 813-22.
- Seil, Michèle et al. 2008. « Pharmacological Evidence for the Stimulation of NADPH Oxidase by P2X(7) Receptors in Mouse Submandibular Glands ». *Purinergic Signalling* 4(4): 347-55.
- Sengstake, Sarah, Eva-Maria Boneberg, et Harald Illges. 2006. « CD21 and CD62L Shedding Are Both Inducible via P2X7Rs ». *International Immunology* 18(7): 1171-78.
- Sharp, Anthony J. et al. 2008. « P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis ». *Journal of Neuroinflammation* 5(1): 33.
- Shechter, Ravid, Anat London, et Michal Schwartz. 2013. « Orchestrated Leukocyte Recruitment to Immune-Privileged Sites: Absolute Barriers versus Educational Gates ». *Nature Reviews Immunology* 13(3): 206-18.
- Shieh, Chu-Hsin et al. 2014. « P2X7-Dependent, but Differentially Regulated Release of IL-6, CCL2, and TNF- α in Cultured Mouse Microglia ». *Glia* 62(4): 592-607.
- Shirani, Afsaneh, et Helen Tremlett. 2010. « The Effect of Smoking on the Symptoms and Progression of Multiple Sclerosis: A Review ». *Journal of Inflammation Research* 3: 115-26.
- Skaper, Stephen D. et al. 2006. « P2X(7) Receptors on Microglial Cells Mediate Injury to Cortical Neurons in Vitro ». *Glia* 54(3): 234-42.
- Sluyter, Ronald. 2015. « P2X and P2Y receptor signaling in red blood cells ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2015.00060> (16 décembre 2022).
- Sluyter, Ronald. 2017. « The P2X7 Receptor ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1051: 17-53.
- Sluyter, Ronald, et Leanne Stokes. 2011. « Significance of P2X7 Receptor Variants to Human Health and Disease ». *Recent patents on DNA & gene sequences* 5(1): 41-54.
- Smith, Kenneth J., et Hans Lassmann. 2002. « The Role of Nitric Oxide in Multiple Sclerosis ». *The Lancet. Neurology* 1(4): 232-41.
- Soldan, Samantha S., et Steven Jacobson. 2016. « Virus-Induced Demyelination: The Case for Virus(es) in Multiple Sclerosis ». *Neurotropic Viral Infections*: 175-220.

- Soldan, Samantha S., et Paul M. Lieberman. 2023. « Epstein–Barr Virus and Multiple Sclerosis ». *Nature Reviews Microbiology* 21(1): 51-64.
- Solini, Anna et al. 2013. « The Purinergic 2X7 Receptor Participates in Renal Inflammation and Injury Induced by High-Fat Diet: Possible Role of NLRP3 Inflammasome Activation ». *The Journal of Pathology* 231(3): 342-53.
- Solini, Anna et al. 2021. « P2X7 Receptor/NLRP3 Inflammasome Complex and α -Synuclein in Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Prospective Study in Neo-Diagnosed, Treatment-Naïve Parkinson's Disease ». *European Journal of Neurology* 28(8): 2648-56.
- Solle, Mike et al. 2001. « Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7Receptors* ». *Journal of Biological Chemistry* 276(1): 125-32.
- Sollid, Ludvig M. 2022. « Epstein-Barr virus as a driver of multiple sclerosis ». *Science Immunology* 7(70): eabo7799.
- Spain, Rebecca et al. 2017. « Lipoic Acid in Secondary Progressive MS: A Randomized Controlled Pilot Trial ». *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 4(5). <https://nn.neurology.org/content/4/5/e374> (30 mars 2023).
- Sperlágh, Beáta, E. Sylvester Vizi, Kerstin Wirkner, et Peter Illés. 2006. « P2X7 Receptors in the Nervous System ». *Progress in Neurobiology* 78(6): 327-46.
- Stanimirovic, Danica, Kristin Kemmerich, Arsalan S. Haqqani, et Graham K. Farrington. 2014. « Chapter Ten - Engineering and Pharmacology of Blood–Brain Barrier-Permeable Bispecific Antibodies ». In *Advances in Pharmacology, Pharmacology of the Blood Brain Barrier: Targeting CNS Disorders*, éd. Thomas P. Davis. Academic Press, 301-35. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1054358914000064> (4 mai 2023).
- Stark, Regina et al. 2018. « T RM Maintenance Is Regulated by Tissue Damage via P2RX7 ». *Science Immunology* 3(30): eaau1022.
- Steeland, Sophie, Roosmarijn E. Vandenbroucke, et Claude Libert. 2016. « Nanobodies as Therapeutics: Big Opportunities for Small Antibodies ». *Drug Discovery Today* 21(7): 1076-1113.
- Stokes, Leanne et al. 2010. « Two Haplotypes of the P2X7 Receptor Containing the Ala-348 to Thr Polymorphism Exhibit a Gain-of-Function Effect and Enhanced Interleukin-1 β Secretion ». *The FASEB Journal* 24(8): 2916-27.
- Stromnes, Ingunn M., et Joan M. Goverman. 2006. « Passive Induction of Experimental Allergic Encephalomyelitis ». *Nature Protocols* 1(4): 1952-60.
- Surprenant, A. et al. 1996. « The Cytolytic P2Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P2X Receptor (P2X7) ». *Science (New York, N.Y.)* 272(5262): 735-38.
- Tahmasebinia, Foozhan, et Arash Pourgholaminejad. 2017. « The Role of Th17 Cells in Auto-Inflammatory Neurological Disorders ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 79(Pt B): 408-16.
- Taylor, Simon R. J. et al. 2008. « Sequential Shrinkage and Swelling Underlie P2X7-Stimulated Lymphocyte Phosphatidylserine Exposure and Death ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180(1): 300-308.

- Taylor, Simon R. J. et al. 2009. « P2X7 Deficiency Attenuates Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20(6): 1275-81.
- Tengvall, Katarina et al. 2019. « Molecular Mimicry between Anoctamin 2 and Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Associates with Multiple Sclerosis Risk ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(34): 16955-60.
- Theiler, M. 1934. « SPONTANEOUS ENCEPHALOMYELITIS OF MICE--A NEW VIRUS DISEASE ». *Science (New York, N.Y.)* 80(2066): 122.
- Thompson, Alan J. et al. 2018. « Diagnosis of Multiple Sclerosis: 2017 Revisions of the McDonald Criteria ». *The Lancet Neurology* 17(2): 162-73.
- Tijink, Bernard M. et al. 2008. « Improved Tumor Targeting of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobodies through Albumin Binding: Taking Advantage of Modular Nanobody Technology ». *Molecular Cancer Therapeutics* 7(8): 2288-97.
- Tomasinsig, Linda et al. 2008. « The Human Cathelicidin LL-37 Modulates the Activities of the P2X7 Receptor in a Structure-Dependent Manner ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(45): 30471-81.
- Tozaki-Saitoh, Hidetoshi et al. 2019. « Transcription Factor MafB Contributes to the Activation of Spinal Microglia Underlying Neuropathic Pain Development ». *Glia* 67(4): 729-40.
- Trautmann, Alain. 2009. « Extracellular ATP in the Immune System: More than Just a "Danger Signal" ». *Science Signaling* 2(56): pe6.
- Van Heeke, Gino et al. 2017. « Nanobodies®++Nanobody Is a Registered Trademark of Ablynx NV. as Inhaled Biotherapeutics for Lung Diseases ». *Pharmacology & Therapeutics* 169: 47-56.
- Venken, Koen et al. 2008. « Compromised CD4+ CD25(High) Regulatory T-Cell Function in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Is Correlated with a Reduced Frequency of FOXP3-Positive Cells and Reduced FOXP3 Expression at the Single-Cell Level ». *Immunology* 123(1): 79-89.
- Verma, Nirupama D. et al. 2021. « Multiple Sclerosis Patients Have Reduced Resting and Increased Activated CD4+CD25+FOXP3+T Regulatory Cells ». *Scientific Reports* 11(1): 10476.
- Verstappen, Gwenny M., Odilia B. J. Corneth, Hendrika Bootsma, et Frans G. M. Kroese. 2018. « Th17 Cells in Primary Sjögren's Syndrome: Pathogenicity and Plasticity ». *Journal of Autoimmunity* 87: 16-25.
- Viglietta, Vissia, Clare Baecher-Allan, Howard L. Weiner, et David A. Hafler. 2004. « Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 199(7): 971-79.
- Virginio, C. et al. 1999. « Pore Dilatation of Neuronal P2X Receptor Channels ». *Nature Neuroscience* 2(4): 315-21.
- Wagner, Catriona A., Pamela J. Roqué, et Joan M. Goverman. 2020. « Pathogenic T Cell Cytokines in Multiple Sclerosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 217(1): e20190460.

- Waldner, H. et al. 2000. « Fulminant Spontaneous Autoimmunity of the Central Nervous System in Mice Transgenic for the Myelin Proteolipid Protein-Specific T Cell Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(7): 3412-17.
- Wan, Ping et al. 2016. « Extracellular ATP Mediates Inflammatory Responses in Colitis via P2 × 7 Receptor Signaling ». *Scientific Reports* 6(1): 19108.
- Wang, Bin, et Ronald Sluyter. 2013. « P2X7 Receptor Activation Induces Reactive Oxygen Species Formation in Erythroid Cells ». *Purinergic Signalling* 9(1): 101-12.
- Wang, Dan, Phillip W. L. Tai, et Guangping Gao. 2019. « Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 18(5): 358-78.
- Wang, Xiaohai et al. 2004. « P2X7 Receptor Inhibition Improves Recovery after Spinal Cord Injury ». *Nature Medicine* 10(8): 821-27.
- Wang, Zhong et al. 2005. « Adeno-Associated Virus Serotype 8 Efficiently Delivers Genes to Muscle and Heart ». *Nature Biotechnology* 23(3): 321-28.
- Wekerle, H. et al. 1994. « Animal Models ». *Annals of Neurology* 36 Suppl: S47-53.
- Wheeler, Michael A. et al. 2020. « MAFG-Driven Astrocytes Promote CNS Inflammation ». *Nature* 578(7796): 593-99.
- Widner, Håkan, et Patrik Brundin. 1988. « Immunological Aspects of Grafting in the Mammalian Central Nervous System. A Review and Speculative Synthesis ». *Brain Research Reviews* 13(3): 287-324.
- Wiley, J. S. et al. 2011a. « The Human P2X7 Receptor and Its Role in Innate Immunity ». *Tissue Antigens* 78(5): 321-32.
- Wiley, James S., et Ben J. Gu. 2012. « A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP ». *Purinergic Signalling* 8(3): 579-86.
- Witting, Anke et al. 2006. « Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(16): 6362-67.
- Wolf, Yochai et al. 2018. « Microglial MHC Class II Is Dispensable for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Cuprizone-Induced Demyelination ». *European Journal of Immunology* 48(8): 1308-18.
- Woo, Marcel S. et al. 2021. « Neuronal metabotropic glutamate receptor 8 protects against neurodegeneration in CNS inflammation ». *Journal of Experimental Medicine* 218(5): e20201290.
- Woods, Lucas T. et al. 2012. « P2X7 receptor activation induces inflammatory responses in salivary gland epithelium ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 303(7): C790-801.
- Xu, Xing Jian et al. 2012. « Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1 ». *Journal of Cell Science* 125(16): 3776-89.

- Yamasaki, Ryo et al. 2014. « Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system ». *Journal of Experimental Medicine* 211(8): 1533-49.
- Yang, Chin-An, et Bor-Luen Chiang. 2015. « Inflammasomes and Human Autoimmunity: A Comprehensive Review ». *Journal of Autoimmunity* 61: 1-8.
- Yang, Jennifer H. et al. 2022. « Therapeutic Advances in Multiple Sclerosis ». *Frontiers in Neurology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.824926> (18 mai 2023).
- Yang, Yin, Meaghan E. Killeen, Tina L. Sumpter, et Alicia R. Mathers. 2021. « P2X7 Receptor Signaling Is Not Required but Can Enhance Th17 Differentiation ». : 2021.03.19.435855. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.19.435855v1> (5 juillet 2023).
- Yegutkin, Gennady G. 2008. « Nucleotide- and Nucleoside-Converting Ectoenzymes: Important Modulators of Purinergic Signalling Cascade ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783(5): 673-94.
- Yiangou, Yiangos et al. 2006. « COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord ». *BMC Neurology* 6(1): 12.
- Yip, Linda et al. 2009. « Autocrine Regulation of T-Cell Activation by ATP Release and P2X7 Receptors ». *The FASEB Journal* 23(6): 1685-93.
- Zanovello, P. et al. 1990. « Responses of Mouse Lymphocytes to Extracellular ATP. II. Extracellular ATP Causes Cell Type-Dependent Lysis and DNA Fragmentation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145(5): 1545-50.
- Zeng, Dehui, Pingbo Yao, et Hong Zhao. 2019. « P2X7, a Critical Regulator and Potential Target for Bone and Joint Diseases ». *Journal of Cellular Physiology* 234(3): 2095-2103.
- Zhan, Jiangshan et al. 2020. « The Cuprizone Model: Dos and Do Nots ». *Cells* 9(4): 843.
- Zhang, Wen-jun. et al. 2020. « The Role and Pharmacological Properties of the P2X7 Receptor in Neuropathic Pain ». *Brain Research Bulletin* 155: 19-28.
- Zhao, Peng. et al. 2022. « Engineering antibody and protein therapeutics to cross the blood–brain barrier ». *Antibody Therapeutics* 5(4): 311-31.
- Zimmermann, Herbert. 2006. « Nucleotide Signaling in Nervous System Development ». *Pflügers Archiv* 452(5): 573-88.
- Zoecklein, Laurie J. et al. 2003. « Direct Comparison of Demyelinating Disease Induced by the Daniel's Strain and BeAn Strain of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 13(3): 291-308.

Résumé

Le récepteur P2X7 (P2RX7) est un récepteur canal cationique dépendant de l'ATP, présent notamment sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes T (LyT) CD4/Tregs et la microglie. Il a un rôle important dans l'inflammation par l'activation de : l'inflammasome NLRP3, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) et la mort cellulaire ; il module également la différenciation des LyT. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre son rôle dans la physiopathologie du modèle de l'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE, un modèle animal de sclérose en plaques, SEP) grâce à une technologie AAVnano développée dans notre laboratoire. Cette méthode consiste en un vecteur AAV codant pour des nanocorps (Ncs) spécifiques de P2RX7, avec une activité soit antagoniste (13A7-Fc) ou potentialisatrice (14D5-dimHLE) du récepteur, qui ont été précédemment sélectionnés et optimisés. L'efficacité de cette technologie a été validée dans le cadre de modèles aigüe et chronique de colite par DSS, où bloquer P2RX7 permettait de diminuer le score clinique alors qu'à l'inverse, le potentialiser exacerbait la maladie. Nous avons également montré qu'une seule injection intramusculaire d'AAVnano codant pour le Ncs antagoniste du P2RX7, permettait leur production durable (au moins 120 jours), une fixation et un blocage de P2RX7 à la périphérie et au niveau du SNC, et ce, de manière équivalente à une injection intracérébrale. En comparaison avec une administration des AAVnano, lorsque les Ncs recombinants étaient directement injectés par voie intraveineuse, une forte dose était nécessaire pour traverser la barrière hématoencéphalique (BHE). Ce résultat implique que le passage du Ncs à travers la BHE est facilité par la production continue obtenue par la technologie AAVnano, qui pourrait être utile pour délivrer des anticorps thérapeutiques dans le SNC. Dans l'EAE, les vecteurs AAVnano codant pour le Ncs antagonistes du P2RX7 ont été injectés soit 3 semaines avant l'induction de l'EAE, soit 4 jours après l'EAE. Nos données ont montré que l'inhibition préalable de P2RX7 entraînait une exacerbation des signes cliniques de l'EAE, et au contraire, une amélioration de la maladie était observée lorsque les AAVnano étaient injectés à postériori. Ce projet ouvre de nouvelles perspectives pour évaluer l'intérêt thérapeutique des Nbs anti-P2RX7 lors de l'EAE et potentiellement pour son application dans la SEP et d'autres maladies associées.

Abstract

The P2X7 receptor (P2RX7) is an ATP-gated cation channel receptor, present in particular on monocytes/macrophages, T lymphocytes (LyT) CD4/Tregs and microglia. It plays an important role during inflammation mainly through the activation of the NLRP3 inflammasome, the induction of pro-inflammatory cytokine production (IL-1 β and IL-18), the induction of cell death, and the modulation of LyT differentiation. The objective of this thesis was to better understand its role in the pathophysiology of the model of experimental autoimmune encephalitis (EAE, an MS animal model) by using an AAVnano technology developed in our laboratory. This technology consists of an AAV vector encoding specific nanobodies (Ncs) binding P2RX7, and with antagonist (13A7-Fc) or potentiating (14D5-dimHLE) activities, that had been previously selected and optimized. This technology was validated by acute and chronic models of colitis induced by DSS, where blocking P2RX7 reduced the clinical score while, conversely, potentiating it increased this score. We have also shown that a single intramuscular injection of blocking AAVnano allowed long-lasting production of these Ncs (at least 120 days), binding and blocking of P2RX7 at the periphery and at the level of the CNS, in a similar way to AAVnano intracerebral injection. In comparison, recombinant Ncs administered through intravenous injection, were only able to cross the blood-brain barrier (BBB) when given at high dose. This result implies that passage of Ncs through the BBB is facilitated by the continuous production achieved by AAVnano technology. This feature may be exploited for the delivery of therapeutic antibodies into the CNS. In EAE, AAVnano vectors encoding the antagonist Ncs were injected either 3 weeks before or 4 days after mice immunization. Our data showed that the inhibition of P2RX7 prior to EAE induction led to an exacerbation of the clinical signs of EAE, and on the contrary, to an improvement of the disease when the AAVnano were injected *a posteriori*. This project offers new perspectives on the therapeutic interest of anti-P2RX7 Nbs during EAE and potentially for its application to MS and other related diseases.