



HAL
open science

Rôles du récepteur P2X7 dans un modèle d'uvéite auto-immune expérimentale

Paul-Alexandre Déchelle-Marquet

► **To cite this version:**

Paul-Alexandre Déchelle-Marquet. Rôles du récepteur P2X7 dans un modèle d'uvéite auto-immune expérimentale. Neurobiologie. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS366 . tel-04903797

HAL Id: tel-04903797

<https://theses.hal.science/tel-04903797v1>

Submitted on 21 Jan 2025

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 de doctorat de Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

*Institut de la Vision / Equipe Inflammation et immunologie dans les
pathologies de la rétine*

Rôles du récepteur P2X7 dans un modèle d'uvéite auto- immune expérimentale

Par Paul-Alexandre DECHELLE-MARQUET

Dirigée par Cécile DELARASSE

Présentée et soutenue publiquement le 08/10/2024

Jury

Dr Séverine BOILLEE

Présidente

Dr Eric BOUE-GRABOT

Rapporteur

Dr Abdelhadi SAOUDI

Rapporteur

Pr Sahil ADRIOUCH

Examineur

Dr Encarnita MARIOTTI-FERRANDIZ

Examinatrice

Dr Cécile DELARASSE

Directrice de thèse

Table des matières

Introduction	7
Chapitre 1 : Anatomie et physiologie de l'œil et de la rétine	8
1) Le segment antérieur	9
2) Le segment postérieur	9
3) La rétine neurale.....	9
a) Les photorécepteurs.....	12
i) Les cônes	12
ii) Les bâtonnets	12
b) Les cellules bipolaires	13
c) Les cellules horizontales	13
d) Les cellules amacrines	13
e) Les cellules ganglionnaires	14
f) Les cellules gliales de la rétine.....	14
i) Les cellules de Müller	14
ii) Les astrocytes	14
iii) La microglie	14
4) Le privilège immun oculaire	15
a) La vasculature rétinienne et les barrières hémato-rétiniennes.....	16
b) Le microenvironnement oculaire	17
Chapitre 2 : Les uvéites	18
1) Classification et épidémiologie	19
a) Classification des uvéites	19
b) Epidémiologie	20
2) L'Uvéite Auto-immune Expérimentale (EAU).....	21
a) L'EAU active	21
b) La susceptibilité à l'EAU.....	23
c) L'EAU passive	23
d) Le suivi de la maladie chez les souris	23
e) Similarités entre la pathologie humaine et le modèle murin	25
3) Pathogenèse de l'uvéite	26

a) Les lymphocytes T dans l'uvéite	26
b) Polarisation lymphocytaire et uvéite	26
i) Les Th1.....	26
ii) Les Th17.....	27
iii) Relations entre Th1 et Th17 dans l'uvéite.....	28
c) Mécanismes régulateurs dans l'uvéite	28
d) La microglie dans l'uvéite.....	31
4) Uvéite, tolérance et auto-immunité.....	32
a) Le développement des lymphocytes T.....	32
i) La tolérance centrale.....	32
ii) La tolérance périphérique	33
b) Antigènes rétinien et tolérance.....	33
c) Auto-réactivité et uvéite.....	34
Chapitre 3 : Le récepteur P2X7	36
1) La signalisation purinergique	36
a) Les récepteurs P1	38
b) Les récepteurs P2Y	38
c) Les récepteurs P2X	39
2) Structure et expression de P2X7	39
a) Structure de P2X7.....	39
b) Distribution tissulaire et cellulaire	41
3) Fonctions de P2X7	41
a) Activation de l'inflammasome NLRP3	41
b) Phagocytose	44
c) Rôle dans les cellules dendritiques.....	45
d) Rôle dans les lymphocytes T	45
4) Fonctions de P2X7 dans les maladies neuro-inflammatoires et auto-immunes.....	46
a) Maladie d'Alzheimer	46
b) Maladie de Parkinson.....	48
c) Sclérose en plaques	49
d) Dégénérescence maculaire liée à l'âge	51
e) Uvéite	52
Objectifs de la thèse	53

Résultats	55
Discussion et perspectives	100
Bibliographie.....	107
Annexes	126

Liste des abréviations

AIRE : AutoImmune REgulator
ATP : Adénosine-5'-triphosphates
BBG : Bleu Brillant G
BHR : Barrière hémato-rétinienne
CCG : Couche des cellules ganglionnaires
CFA : Complete Freund's Adjuvant
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide
CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II
CNE : Couche nucléaire externe
CNI : Couche nucléaire interne
CPA : Cellules présentatrices de l'antigène
CPE : Couche plexiforme externe
CPI : Couche plexiforme interne
DC : Dendritic cells
EAU : Experimental Autoimmune Uveitis
EPR : Epithélium pigmentaire rétinien
IFN- γ : Interféron- γ
IL-1 α : Interleukine-1 α
IL-1 β : Interleukine-1 β
IL-17 : Interleukine 17
IRBP : Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein
IUSG : International Uveitis Study Group
LPS : Lipopolysaccharides
 α -MSH : α -melanocyte-stimulating hormone
MDM : Monocyte-Derived Macrophages
MIF : Macrophage Migration Inhibitory Factor
MP : Mononuclear Phagocytes
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NLRP3 : NLR family pyrin domain containing 3

oATP : Oxidized ATP

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PTX : Pertussis Toxin

S-Ag : S-Antigen

SNC : Système nerveux central

SUN : Standardization of Uveitis Nomenclature

TCR : T Cell Receptor

TGF- β 2 : Transforming Growth Factor- β 2

Th : T helper lymphocytes

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

Tregs : Cellules T régulatrices

TSP : Thrombospondin

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

VKH : Syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Anatomie et physiologie de l'œil et de la rétine

L'œil est l'organe hautement spécialisé de la vue, sens fondamental permettant à des êtres vivants d'interagir avec leur environnement par la captation et le transfert des signaux lumineux qui en sont issus. Dans le Vivant, les organes de la vision varient en complexité, allant de simples cellules photosensibles à des structures extrêmement complexes capables de distinguer les formes, les couleurs.

L'œil humain est une sphère asymétrique d'un diamètre d'environ 25 mm constituée de trois enveloppes :

- La tunique externe est composée d'une membrane opaque, appelée la **sclère**, prolongée par la **cornée** qui est une membrane transparente permettant l'entrée des signaux lumineux.
- La tunique médiane est composée de la **choroïde**, prolongée en avant par l'**iris**, de la **pupille**, du **corps ciliaire** et du **cristallin**.
- La tunique interne, partie sensible de l'œil, est composée de la **rétine** et du **nerf optique**.

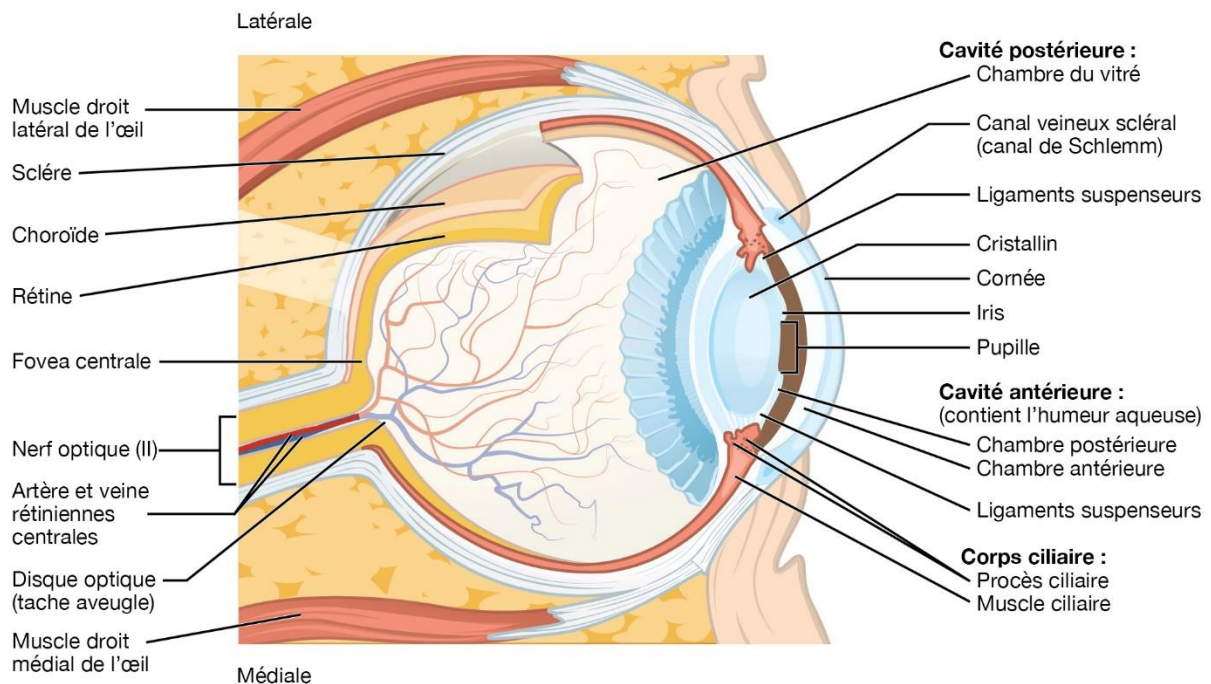


Figure 1 : Anatomie générale de l'œil humain. Issu de Jardel, Caujolle, Gastaud et al., 2015.

L'œil est divisé en deux parties : le **segment antérieur**, localisé entre la cornée et le cristallin, et le **segment postérieur**, situé en arrière du cristallin (Addo, Bamiro et al., 2016).

1) Le segment antérieur

La **cornée** occupe la plus grande surface du segment antérieur. C'est une membrane transparente, avasculaire, séparant l'œil de l'environnement et comptant pour deux-tiers du pouvoir de réfraction oculaire. En arrière de la cornée et devant le cristallin se trouve l'**iris**, percé en son centre par la **pupille** qui laisse passer les rayons lumineux. L'**iris** est une membrane pigmentée, donnant sa couleur à l'œil et contrôlant la dilatation de la pupille grâce à deux muscles lisses : le muscle dilatateur de la pupille et le muscle sphincter de la pupille dilatant ou resserrant la pupille respectivement. Le **corps ciliaire** est composé du muscle ciliaire, qui maintient le cristallin en place et aide à l'accommodation, et de l'épithélium ciliaire, qui sécrète l'humeur aqueuse.

L'**humeur aqueuse** est un liquide transparent qui remplit les chambres postérieure et antérieure de l'œil. La chambre postérieure est une cavité localisée en avant du cristallin et derrière l'iris et la chambre antérieure est située entre la cornée et l'iris. L'humeur aqueuse apporte des nutriments à la cornée et au cristallin et joue un rôle essentiel dans le privilège immun oculaire. Cet aspect sera abordé dans le chapitre 2 section 3.c.

2) Le segment postérieur

Le constituant principal du segment postérieur est une substance gélatineuse transparente, appelée le **vitré**, occupant 90% du volume de l'œil. Il est enveloppé par une fine membrane, appelée l'hyaloïde, en contact avec la rétine. Le vitré maintient la rétine contre la paroi du globe oculaire et permet le maintien de la forme de l'œil. Le segment postérieur est entouré par la **sclère**, la couche externe du globe oculaire et la tunique la plus résistante de l'œil. Elle assure sa protection contre de potentiels dégâts et le maintien de sa structure. Elle est traversée en arrière de l'œil par le **nerf optique** et se prolonge par la **cornée** en avant de l'œil. La **choroïde** se situe entre la sclère et la rétine. Il s'agit d'une couche pigmentée et hautement vascularisée assurant la nutrition et l'oxygénation des structures oculaires internes non vascularisées. La choroïde, l'iris et le corps ciliaire forment l'**uvée**.

3) La rétine neurale

La rétine tapisse la face interne du globe oculaire. Il s'agit d'une fine membrane d'environ 0,5 mm d'épaisseur dont la fonction est de capter les signaux lumineux de l'environnement et de les convertir en signaux nerveux qui seront transmis au cerveau par le nerf optique.

La rétine contient une partie neurale, incluant les photorécepteurs, les cellules horizontales, amacrines, bipolaires et ganglionnaires, et une partie épithéliale, constituée de l'épithélium pigmentaire rétinien. Elle est constituée de dix couches (**Figure 2**), disposées comme suit, de l'intérieur vers l'extérieur du globe oculaire (Behar-Cohen, Gelizé, Jonet et Lassiàz 2020) :

- La membrane limitante interne. Elle est formée par les pieds internes des cellules de Müller et d'une membrane basale. Elle sépare la rétine du vitré ;
- La couche des fibres nerveuses, constituée par les axones des cellules ganglionnaires. La convergence de ces axones forme le nerf optique relié au cerveau ;
- La couche des cellules ganglionnaires qui contient les noyaux de celles-ci ;
- La couche plexiforme interne formée par les dendrites des cellules ganglionnaires et les axones des cellules bipolaires ;
- La couche nucléaire interne où se situent les noyaux des cellules horizontales, bipolaires, amacrines et des cellules gliales de Müller. Les cellules amacrines les plus internes y sont présentes ;
- La couche plexiforme externe formée par les synapses entre les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les photorécepteurs ;
- La couche nucléaire externe, qui contient les noyaux des photorécepteurs
- La membrane limitante externe, lieu de connexion des cellules gliales de Müller avec les segments internes des photorécepteurs ;
- Les segments externes et internes des photorécepteurs ;
- La couche des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La membrane de Bruch sépare la choroïde de l'EPR.

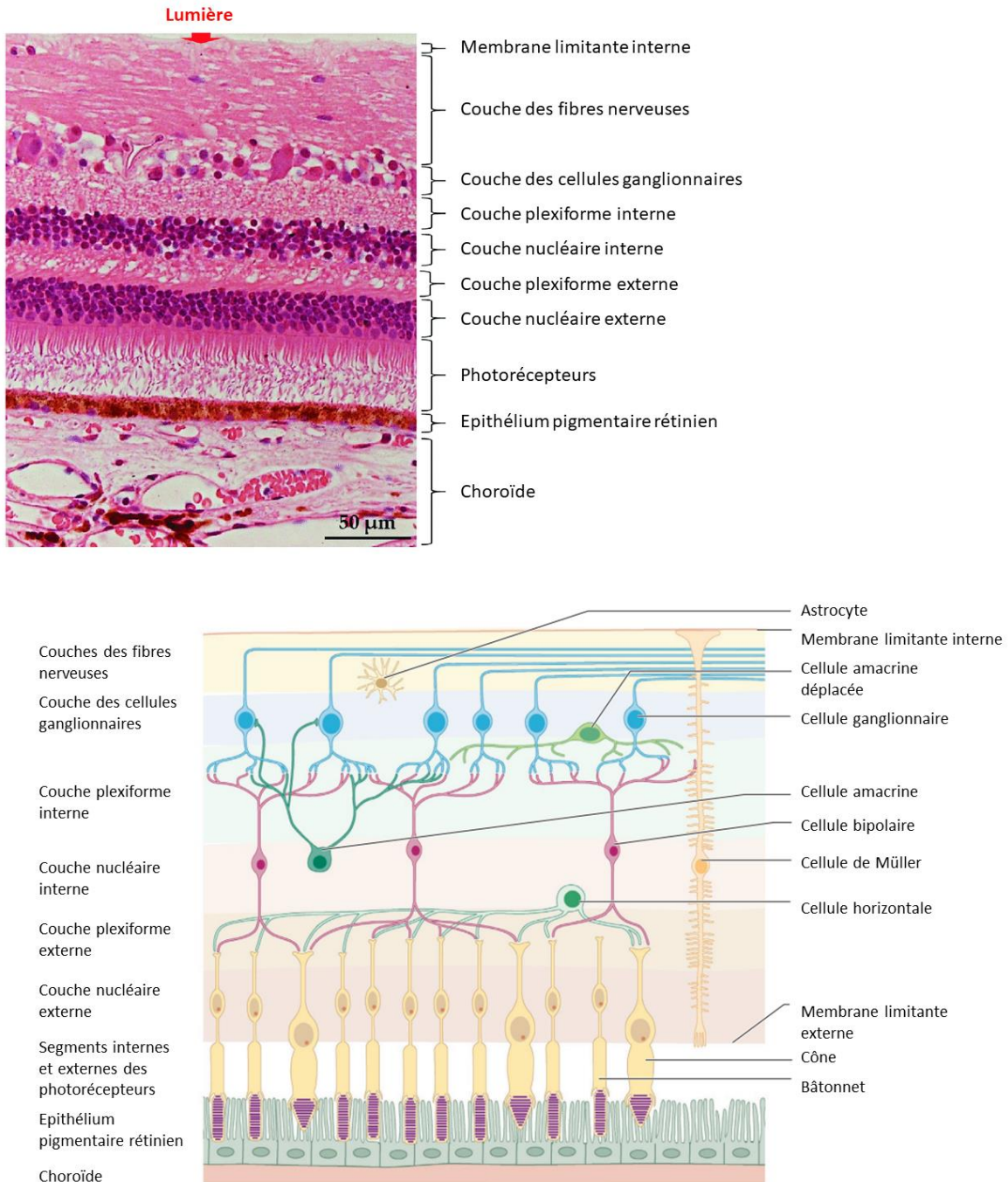


Figure 2 : Anatomie de la rétine. En haut : Coupe histologique d'une rétine humaine. Les couches cellulaires sont présentées de l'intérieur vers l'extérieur de l'œil. Le trajet de la lumière est indiqué en rouge. En bas : Schéma d'une rétine humaine présentant les cellules de chaque couche. Issu de Ding, Kumar et Mok 2017 et de Lee, Morgan et al., 2015.

a) Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont des cellules neuronales qui assurent la phototransduction, c'est-à-dire la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique puis biochimique. Structuellement, un photorécepteur est composé d'un segment externe, d'un segment interne relié au segment externe par un cil connecteur, d'un corps cellulaire contenant le noyau, et d'une terminaison synaptique interagissant avec les cellules horizontales et les cellules bipolaires (Kolb H. 2005).

Le segment externe est la partie photosensible du photorécepteur. Il contient un empilement de disques membranaires formés à partir d'invagination de la membrane où sont localisés les pigments visuels. Les photorécepteurs renouvellent leur segment externe continuellement grâce à la phagocytose des disques par l'EPR. Le segment interne contient la machinerie cellulaire assurant le métabolisme du photorécepteur (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) et lui fournissant l'énergie nécessaire pour la phototransduction (Fu Y. 2010).

I. Les cônes

Les cônes représentent 5 à 10 % des photorécepteurs chez l'homme et sont principalement localisés au niveau de la fovéa au centre de la rétine. Ils assurent la vision diurne et des couleurs. Ils contiennent un pigment photosensible, la iodopsine, possédant plusieurs formes qui définissent la longueur d'onde qui peut être captée par le cône. Il existe trois types de cônes :

- Les cônes bleus (10 % des cônes) contiennent la iodopsine « S » et absorbent entre 400 nm et 500 nm avec un pic à 420 nm
- Les cônes verts (30 % des cônes) contiennent la iodopsine « M » et absorbent entre 450 nm et 650 nm avec un pic à 530 nm
- Les cônes rouges (60 % des cônes) contiennent la iodopsine « L » et absorbent entre 450 nm et 700 nm avec un pic à 560 nm

II. Les bâtonnets

Les bâtonnets ont un segment externe de forme cylindrique plus long que celui des cônes. Ils représentent 95 % des photorécepteurs et sont essentiellement présents en périphérie de la rétine. Ils sont absents de la fovéa. Ils contiennent un pigment visuel, appelé rhodopsine, hautement sensible à la lumière et impliqué dans la vision nocturne.

Les disques du segment externe des bâtonnets sont séparés de la membrane plasmique tandis que ceux des cônes restent ancrés à la membrane (**Figure 3**).

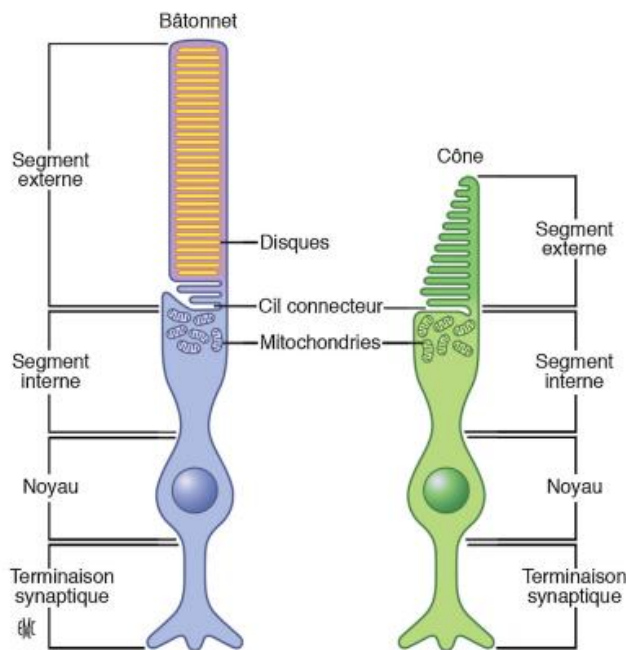


Figure 3 : Représentation schématique d'un bâtonnet et d'un cône. Issu de C. Salesse 2017.

b) Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires font la jonction entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires. Elles sont définies selon le photorécepteur avec lequel elles interagissent. Il existe dix types de cellules bipolaires pour les cônes et un seul pour les bâtonnets, celui-ci constituant la population majoritaire dans la rétine humaine. La libération du glutamate par les photorécepteurs varie selon l'exposition lumineuse et induit une modification de la polarisation des cellules bipolaires (ON/OFF) selon le récepteur au glutamate qu'elle possède (Nelson R, Connaughton V. 2007).

c) Les cellules horizontales

Les cellules horizontales forment un réseau latéral dans la couche plexiforme externe où elles interagissent avec les photorécepteurs et les inhibent grâce à une boucle de rétroaction négative lorsque ceux-ci sont hyperpolarisés (Barnes, Grove, McHugh et al., 2020).

d) Les cellules amacrines

Les cellules amacrines sont des interneurons localisés principalement dans la couche plexiforme interne où elles interagissent avec les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Elles exercent une activité inhibitrice sur ces cellules par la libération de GABA ou de glycine (Franke et Baden., 2017).

e) Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires récoltent l'information visuelle issue des cellules bipolaires et des cellules amacrines et la transmettent au cerveau.

f) Les cellules gliales de la rétine

On trouve trois types de cellules gliales dans la rétine : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales (Kolb H. 2001).

i. Les cellules de Müller

Les cellules de Müller sont les cellules gliales les plus communes dans la rétine. Elles s'étendent sur toute la rétine entre la membrane limitante interne et la membrane limitante externe et participent au maintien de la structure de la rétine (Reichenbach et Bringmann 2019). Elles régulent entre autres le taux de glutamate autour des synapses (Bringmann et al., 2013).

ii. Les astrocytes

Les astrocytes sont localisés principalement dans la couche des fibres nerveuse et dans la couche des cellules ganglionnaires (Reichenbach et Bringmann 2019). Ces cellules participent au maintien de l'homéostasie rétinienne en assurant des fonctions similaires aux cellules de Müller comme l'élimination du dioxyde de carbone ou la régulation du pH extracellulaire (Newman 1999). En cas de dommages à la rétine, elles s'activent et prolifèrent afin d'assurer la protection des cellules ganglionnaires.

iii. La microglie

Les cellules microgliales, ou microglie, sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC). Elles ont pour origine embryonnaire des progéniteurs erythro-myéloïdes localisés dans le sac vitellin (Ginhoux et al., 2010) et représentent 5 à 20% des cellules du SNC (Ransohoff et Cardona 2010). Dans la rétine, la microglie représente 0,2 % des cellules (Li, Jiang et Samuel 2019). La microglie rétinienne est une population extrêmement stable qui possède la capacité de s'auto-renouveler en cas d'altération de son nombre (Huang, Xu et al., 2018 ; Zhang, Zhao et al., 2018). Dans la rétine de souris adulte, elle est principalement localisée dans les couches des cellules plexiformes (CPE et CPI) où elle adopte une morphologie présentant de longues ramifications se prolongeant dans les couches des noyaux cellulaires. En conditions physiologiques, la CNE est la seule région de la rétine où les cellules microgliales sont absentes (Santos, Calvente et al., 2008) (**Figure 4**). Elles sont impliquées dans la synaptogenèse, le développement de la vasculature rétinienne et la clairance des neurones apoptotiques (Murenu, Gerhardt et al., 2022). Elle participe activement à la phagocytose des débris

cellulaires, essentielle dans le maintien de l'homéostasie rétinienne (Nimmerjahn et al., 2005). La microglie joue un rôle central dans l'immuno-surveillance du SNC grâce à un ensemble de récepteurs membranaires (cytokines, chimiokines, complément, immunoglobulines) lui permettant de détecter des perturbations dans son environnement (Karlstetter, Scholz et al., 2015). La rupture de l'homéostasie rétinienne entraîne leur activation qui se manifeste par une modification de leur morphologie et leur migration vers le site lésé où elles initient un processus d'inflammation et de réparation. Elles acquièrent notamment la capacité de migrer dans la CNE, l'EPR et l'espace sous-rétinien (Kettenmann, Hanisch et al., 2011).

L'activité de la microglie est régulée par ses interactions avec les autres cellules de la rétine au travers notamment de la protéine CX3CL1, ou fractalkine (Bazan et al., 1997 ; Cardona et al., 2006). Cette protéine est sécrétée par les neurones rétiniens et les cellules endothéliales (Cardona et al., 2006). Elle est aussi exprimée à la surface des neurones où elle interagit avec le récepteur CX3CR1 présent à la surface des cellules microgliales inhibant en particulier leur capacité de migration (Liang, Lee et al., 2009).

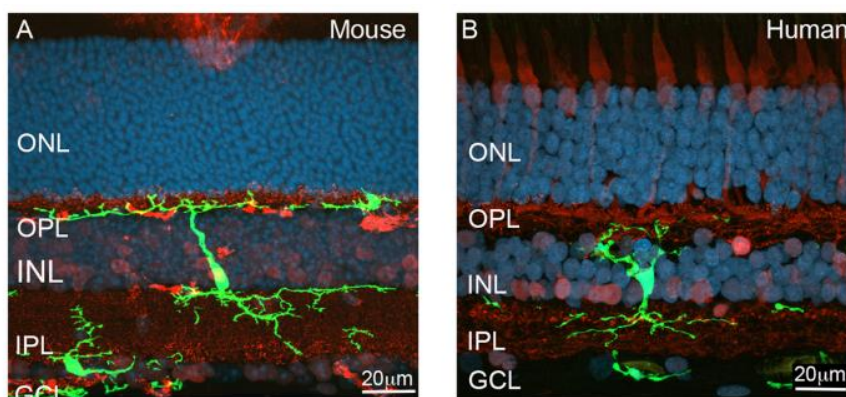


Figure 4 : Localisation de la microglie dans la rétine chez la souris (gauche) et l'homme (droite). Figure issue de Dixon, Greferath, Fletcher et Jobling., 2021 ONL = CNE; OPL = CPE; INL = CNI; IPL = CPI; GCL = CCG (A) Coupe d'une rétine de souris CX3CR1+/GFP. La microglie apparaît en vert dans l'OPL et l'INL et ses ramifications se prolongent dans l'IPL. Les noyaux apparaissent en bleu. (B) Coupe d'une rétine humaine. La microglie apparaît en vert, immunomarquée avec un anticorps anti-Iba1. Les noyaux apparaissent en bleu.

4) Le privilège immun oculaire

Le concept de « privilège immun » fut établi par Sir Peter Medawar dans les années 1940 pour caractériser la survie de greffes de peau allogéniques dans la chambre antérieure de l'œil (Medawar 1948 ; Streilein 2003). L'absence de rejet de la greffe, c'est-à-dire de réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre celle-ci, fut attribuée à la séquestration des antigènes de la greffe dans l'œil et à

l'*ignorance* de ceux-ci par le système immunitaire (Niederhorn 2003). Les recherches de ces dernières décennies ont radicalement fait évoluer cette vision. Ce phénomène qui auparavant était attribué à une potentielle ignorance immunologique est aujourd'hui défini comme un ensemble de mécanismes actifs et passifs, physiques et moléculaires, permettant à un tissu ou à un organe de moduler la réponse immunitaire (Forrester, Lambe et al., 2008). Ce phénomène n'est pas restreint à l'œil et est observé dans d'autres organes comme le cerveau, les testicules, les ovaires ainsi que dans le placenta. Ces organes assurent des fonctions vitales et ont une organisation complexe, constituée de cellules hautement différenciées et incapables de se régénérer si elles sont endommagées. Dans l'œil, les dommages aux photorécepteurs et la distorsion de l'axe visuel causés par l'inflammation peuvent entraîner une baisse de l'acuité visuelle voire la perte totale de la vision.

Le privilège immun est le résultat d'une *expérience de la nature* comme le dit J. Wayne Streilein, le produit de l'évolution et de la sélection naturelle, permettant à certains tissus de se protéger contre des pathogènes et de limiter les dommages de la réponse immunitaire afin de préserver leur intégrité (Streilein 2003).

Dans l'œil, le privilège immun fait intervenir des barrières anatomiques, qui séparent l'œil de la circulation sanguine périphérique, et un microenvironnement intraoculaire immunosuppressif (Niederhorn 2003).

a) La vasculature rétinienne et les barrières hémato-réiniennes

La rétine est approvisionnée en nutriments et en oxygène par deux systèmes vasculaires issus de l'artère ophtalmique : le réseau choroïdien qui innerve la choroïde et la partie externe de la rétine, comprenant la couche des photorécepteurs et l'EPR, et le réseau rétinien qui innerve les couches internes de la rétine (Tomkins-Netzer, Niederer et al., 2024). La première composante du « privilège immun oculaire » est la séparation physique de l'œil de la circulation systémique par deux barrières hémato-réiniennes, externe et interne, qui régulent les échanges d'ions, de molécules et d'eau et bloquent l'entrée de cellules circulants à la périphérie de l'œil (O'Leary, Campbell et al., 2023). La barrière hémato-réinienne externe sépare le réseau choroïdien de la rétine. Elle est composée de la monocouche de cellules de l'EPR, imperméable du fait de jonctions serrées entre ces cellules, ainsi que de la membrane de Bruch, localisée entre la choroïde et l'EPR. La barrière hémato-réinienne interne est constituée par les cellules endothéliales du réseau rétinien. La séparation est assurée par les jonctions serrées entre ces cellules et la membrane basale sur laquelle repose ces cellules. Les cellules de Müller, les astrocytes et les péricytes participent activement à cette barrière en interagissant avec les cellules endothéliales et en assurant leur stabilité.

b) Le microenvironnement oculaire

Les tissus oculaires et les chambres fluidiques de l'œil produisent un ensemble de protéines, solubles ou ancrées à la membrane des cellules, aux propriétés immunosuppressives. Elles sont présentées dans les tables 1 et 2. Parmi ces molécules, l'une des plus importantes est FasL (CD95L), exprimé par les tissus localisés aux jonctions entre l'œil et la circulation systémique à savoir l'épithélium de l'iris, l'endothélium de la cornée, la rétine et le corps ciliaire. FasL interagit avec Fas (CD95) exprimé par les cellules immunitaires et induit leur apoptose (Griffith et al., 1995).

Facteurs	Activités
TGF-β2	Inhibe l'activité des cellules T, des cellules NK et des macrophages ; dote les CPA de propriétés tolérogènes (Cousins et al., 1991)
α-MSH	Polarise les cellules T productrices d'IFN-γ en Tregs ; inhibe l'activation des polymorphonucléaires (Taylor et al., 1992 ; Namba et al., 2002)
VIP	Inhibe l'activité des cellules T (Taylor et al., 2003)
CGRP	Inhibe l'activation des macrophages (Taylor et al., 1998)
TSP	Bloque l'expression de l'IL-12 et de CD40 par les CPA (Sheibani et al., 2000)
MIF	Inhibe la mort induite par les cellules NK (Apte et al., 1998)
IL-1α	Inhibe les effets pro-inflammatoires de l'IL-1α/β (Kennedy et al., 1995)
CD46, CD55 et CD59	Inhibent l'activation du complément (Sohn et al., 2000)
CD95L	Bloque le recrutement des polymorphonucléaires et leur activation (Sugita et al., 2000)

Table 1 : Facteurs solubles de l'humeur aqueuse impliqué dans le privilège immun de l'œil. Adapté à partir de Streinlein 2003 et Niederkorn 2003

Facteurs	Activités	Expression
CD95L	Induit l'apoptose des cellules T CD95+ ; active les polymorphonucléaires	Epithélium pigmenté de l'iris, corps ciliaire, rétine, endothélium de la cornée (Stuart et al., 1997 ; Yamagami et al., 1997; Gregory et al., 2002)
CD46, CD55, CD59 et Crry	Inhibent l'activation du complément et la stabilité du complexe d'attaque membranaire	Epithélium pigmentaire de l'iris, corps ciliaire, rétine, endothélium de la cornée (Bora et al., 1993)
CD86	Inhibe l'activation des cellules T par CTLA4	Epithélium pigmenté de l'iris (Sugita et Streilein 2003)
Galectin-1	Inhibe l'activité des cellules T	EPR (Ishida et al., 2003)
CMH de classe Ib	Inhibe les cellules NK	Epithélium de la cornée, corps ciliaire, rétine (Niederhorn et al., 1999)

Table 2 : Molécules de surface impliquées dans le privilège immun de l'œil. Adapté à partir de Streilein 2003 et Niederhorn 2003

Chapitre 2 : Les uvéites

Le terme « uvéite » désigne un ensemble de maladies oculaires, aux manifestations cliniques et aux étiologies différentes, caractérisées par une inflammation du tissu uvéal, comprenant l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Généralement, ce terme désigne toute inflammation intra-oculaire, touchant l'iris, le corps ciliaire, la choroïde, la rétine et le vitré.

Les uvéites sont des maladies complexes et hétérogènes, aux étiologies diverses, pouvant être de nature infectieuse, auto-immune, idiopathique ou associées à des maladies systémiques. Bien que rares, avec une incidence de 17 à 52 cas pour 100 000 habitants par an, les uvéites ont des conséquences extrêmement sévères sur la vision et sont responsables de 5 à 10 % des cas de cécité visuelle dans le monde (Forrester, Kuffova et Dick., 2018 ; Burkholder et Jabs 2021).

Les premières descriptions des uvéites remontent à la Grèce antique par Hippocrate mais ont été aussi observées par les médecins grecs Galien et Aétios d'Amida (Foster and Vitale ; 2013). Au début du XIXe siècle, le chirurgien Antonio Scarpa rapporte le cas d'une femme âgée considérée comme aveugle à cause d'une ophtalmie causée par un mauvais positionnement de certains cils sur l'œil gauche (Scarpa ;

1806). En 1830, l'ophtalmologiste écossais William Mackenzie décrit une uvéite pour la première fois dans la littérature anglaise dans son *Traité pratique des maladies des yeux* (Mackenzie ; 1830). Depuis 1952, les corticostéroïdes sont utilisés pour traiter les uvéites et demeurent la principale thérapie utilisée.

1. Classification et épidémiologie

a. Classification des uvéites

Les uvéites sont classées selon la localisation anatomique de l'inflammation en trois catégories : antérieure (chambre antérieure), intermédiaire (vitré) et postérieure (rétine et/ou choroïde). Dans le cas où l'inflammation est étendue à l'ensemble de ces zones, on parle de panuvéite. La première méthode de classification des uvéites a été proposée en 1987 par l'International Uveitis Study Group (IUSG) (Bloch-Michel E et al., 1987). En 2004, le Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group a validé et précisé cette terminologie (**Table 1**). Les uvéites peuvent aussi être caractérisées selon leur apparition (soudaine ou insidieuse), leur durée (limitée ou persistante) et leur évolution clinique (aiguë, récurrente ou chronique). En 2008, l'IUSG a proposé une classification des uvéites afin de décrire leurs causes. Cette classification distingue les uvéites infectieuses, non-infectieuses et masquées (symptôme secondaire d'une maladie systémique) (Deschenes et al., 2008). Parmi les uvéites liées à des maladies systémiques, on peut citer les uvéites postérieures associées à la maladie de Behçet (Ksiaz, Abroug, Kechida, Zina et al., 2019) ou au syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) (Burkholder et Bryn 2015).

Type	Site primaire de l'inflammation	Inclut
Uvéite antérieure	Chambre antérieure	Iritis Iridocyclite Cyclite antérieure
Uvéite intermédiaire	Vitré	Pars planite Cyclite postérieure Hyalite
Uvéite postérieure	Rétine ou choroïde	Choroïdite focale, multifocale ou diffuse Chroriorétinite Retinochoroïdite Rétinite Neurorétinite
Panuvéite	Chambre antérieure, vitré et rétine ou choroïde	

Table 3 : Classification anatomique des uvéites selon le SUN

Catégorie	Description	
Apparition	Soudaine Insidieuse	
Durée	Limitée Persistante	Durée inférieure ou égale à trois mois Durée supérieure à trois mois
Evolution	Aiguë Récurrenente Chronique	Episode caractérisé par une apparition soudaine et une durée limitée Episodes répétés séparés par des périodes d'inactivité sans traitement supérieures ou égales à trois mois Uvéite persistante avec rechute moins de trois mois après l'arrêt du traitement

Table 4 : Classification des uvéites selon leur évolution clinique selon le SUN (2004)

Infectieuse	Bactérienne Virale Fongique Parasitique Autres
Non infectieuse	Avec association systémique connue Sans association systémique connue
Mascarade	Néoplasique Non néoplasique

Table 5 : Classification étiologique des uvéites selon l'IUSG (2008)

b. Epidémiologie

Une étude publiée en 2018 a regroupé l'ensemble des enquêtes épidémiologiques publiées sur PubMed jusqu'en 2015 (Tsirouki et al., 2018). L'incidence et la prévalence des uvéites diffèrent selon l'âge, la localisation anatomique, le genre, le type de processus inflammatoire et l'étiologie et on estime jusqu'à 35 % des patients atteints d'uvéite souffrant d'une perte visuelle importante. Les uvéites antérieures sont la forme la plus commune d'inflammation intraoculaire. Les uvéites postérieures sont la deuxième forme la plus commune d'uvéite (15-30% des cas d'uvéites) et les uvéites intermédiaires les moins communes (15 % de toutes les uvéites). La cause sous-jacente des uvéites est généralement non identifiée, celle-ci n'est pas identifiée chez 30 à 60 % des patients. La prévalence des uvéites infectieuses est très importante dans les pays en voie de développement, comptant pour 30 à 50 % de tous les cas d'uvéites, tandis que les uvéites non-infectieuses sont plus communes dans les pays développés. Les adultes âgés de 20 à 50 ans sont plus communément affectés et représentent 60 à

80 % des cas d'uvéïtes. Les uvéïtes sont très rares chez les enfants âgés de moins de 10 ans et les adultes de plus de 70 ans.

2. L'Uvéïte Auto-immune Expérimentale (EAU)

L'uvéïte auto-immune expérimentale (Experimental Autoimmune Uveitis), ou EAU, est le modèle le plus fréquemment utilisé pour représenter les uvéïtes postérieures, d'origine supposément auto-immune, observées chez l'homme. Le caractère auto-immun de cette maladie sera développé dans la **section 4**). Ce modèle a permis d'étudier plusieurs aspects de ces maladies : les facteurs génétiques prédisposant à cette maladie, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la rupture ou le maintien de la tolérance aux auto-antigènes et la cascade d'événements immunologiques déclenchés au cours d'une réponse auto-immune.

a) L'EAU active

Le premier modèle d'uvéïte auto-immune expérimentale fut développé chez le cobaye par Aronson et al., en 1963 en injectant dans l'œil des extraits de tissu uvéal homologues. Par la suite, Wacker et al., adaptèrent en 1973 ce modèle chez le rat en injectant des extraits de photorécepteurs en intraoculaire. En 1981, le modèle fut affiné par Kozak et al., qui utilisèrent un antigène rétinien purifié, l'antigène soluble rétinien ou arrestine (S-Antigen), à la place d'extraits cellulaires, en combinaison avec un adjuvant bactérien. Finalement, l'EAU fut adaptée en 1988 chez la souris par Caspi et al., où la maladie est induite par immunisation avec l'Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP). Cette glycoprotéine est sécrétée par les cellules photoréceptrices et présente dans la matrice entre les photorécepteurs. Elle joue un rôle critique dans le transport du 11-cis-retinal entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmenté rétinien (EPR), mécanisme nécessaire à sa régénération, à la suite de sa photolyse, et central dans le cycle visuel. (Zeng et al., 2020).

L'EAU vise à recréer un contexte inflammatoire dans lequel des auto-antigènes sont reconnus et présentés à leurs lymphocytes respectifs menant au déclenchement d'une réponse auto-immune. Pour induire l'EAU, des antigènes rétiniens sont émulsifiés dans une solution d'huile minérale et de *Mycobacterium tuberculosis* de la souche H37Ra inactivées connue sous le nom d'Adjuvant Complet de Freund (Complete Freund's Adjuvant, CFA) et injectés en sous-cutané. Chez certaines souches de souris, une injection supplémentaire de toxine pertussique (Pertussis toxin, PTX, issue de la bactérie *Bordetella pertussis*) est requise afin de stimuler la réponse immunitaire adaptative (Silver et al., 1999). La toxine pertussique est connue pour sa capacité à favoriser la rupture de la barrière hémato-rétinienne ainsi qu'à stimuler les réponses Th1 et Th17, impliquées dans la pathogénie de l'EAU (**voir section 3.b**) (Caspi, Grubs et al., 1992 ; Silver et al., 1999 ; Agarwal, Silver, et al., 2012).

Les antigènes capables d'induire une uvéite chez un animal sont appelés uvéitogènes. Ces antigènes sont connus pour déclencher une réponse chez des lymphocytes T issus de patients atteints d'uvéite (Caspi 2010). Les uvéitogènes les plus utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Table 6**). Le S-Ag est connu pour induire une uvéite chez le cobaye ainsi que le rat. Les souris en revanche sont insensibles à cet antigène et ne répondent qu'à l'IRBP (Hirose et al., 1991 ; Caspi et al., 1992).

Antigène	Poids moléculaire (kDa)	Description
Antigène soluble rétinien (S-Ag ou Arrestine)	44	Protéine intracellulaire impliquée dans la cascade de phototransduction
Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)	148	Présente dans l'espace extracellulaire entre l'EPR et les cellules photoréceptrices ; impliquée dans le transport des dérivés de la vitamine A entre les photorécepteurs et l'EPR
Rhodopsine, opsine	40	Protéine membranaire ; pigment visuel des bâtonnets
Recoverine	23	Protéine liant le calcium contrôlant la phosphorylation de la rhodopsine durant la phototransduction
Phosducine	33	Protéine présente dans le cytosol des photorécepteurs

Table 6 : Protéines rétiniennes uvéitogéniques. Issu de Caspi R.R 2003

L'EAU induite par immunisation active est monophasique et dure de deux à trois semaines. Les premiers symptômes apparaissent dix jours après immunisation. Elle peut être divisée en deux phases : afférente et efférente/effectrice. Durant la phase afférente, qui dure de cinq à sept jours, l'antigène est reconnu par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et présenté aux cellules effectrices, les lymphocytes T CD4+, dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette phase est suivie par la phase efférente où les cellules effectrices quittent les organes lymphoïdes secondaires, migrent dans l'œil où elles reconnaissent leur antigène localement et se réactivent. Elles sécrètent alors des cytokines et des chimiokines et activent la vasculature rétinienne entraînant le recrutement massif de cellules immunitaires depuis la périphérie, notamment des monocytes, des neutrophiles et lymphocytes T polyclonaux, responsables de la destruction tissulaire et de la mort des photorécepteurs. La suite de

ces événements conduit à l'apparition de symptômes reconnaissables dans les cinq à sept jours suivants, pouvant persister durant plusieurs semaines à plusieurs mois, selon l'espèce chez laquelle la maladie a été induite (Caspi R.R 2003 ; Perez et Caspi., 2015).

b) La susceptibilité à l'EAU

La sévérité et l'évolution clinique de l'EAU varient selon la souche et le mode d'immunisation. Le fond génétique est grandement responsable de la susceptibilité à l'EAU et certaines souris sont résistantes même après injection de Toxine Pertussique. L'haplotype du CMH II (H-2) détermine fortement la susceptibilité de la souris à développer l'EAU ainsi que sa sévérité. L'haplotype le plus susceptible est H-2r, présent chez la souris B10.RIII. La souris C57Bl/6, qui possède un haplotype H-2b, a une susceptibilité modérée (Caspi R.R, Grubbs BG, et al., 1992). La sévérité de la maladie peut aussi varier selon l'épitope de l'IRBP employé. La souris B10.RIII répond au peptide 161-180 de l'IRBP humaine (hIRBP) (Silver et al., 1995) tandis que le peptide 1-20 est utilisé pour la souris C57Bl/6 (Avichezer et al., 2000). Plus récemment, Mattapallil et al., ont identifié un épitope de l'IRBP humaine (651-670) entièrement conservé entre l'homme, la souris et des espèces bovines et causant une maladie plus sévère et uniforme chez la souris C57Bl/6 (Mattapallil et al., 2015).

c) L'EAU passive

L'EAU peut aussi être induite chez la souris par le transfert adoptif de lymphocytes T auto-réactifs. Des souris donneuses sont immunisées avec l'un des peptides uvéitogènes de l'IRBP et les cellules des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques drainants) sont isolées et mises en culture avec le peptide immunisant pendant trois jours. Au cours de cette étape, les lymphocytes T cultivés peuvent être polarisés à l'aide de molécules ou de cytokines les orientant soit vers les phénotypes Th1 ou Th17. A la fin de l'étape de culture, les lymphocytes sont purifiés puis injectés chez les souris receveuses par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. Cette méthode permet d'outrepasser la phase d'activation décrite précédemment et ne consiste qu'en une phase purement effectrice permettant d'étudier précisément le rôle des lymphocytes T dans la maladie (Caspi R.R 2003).

d) Le suivi clinique de la maladie chez la souris

Le suivi de l'évolution clinique de la maladie peut être réalisé chez des animaux ayant un œil pigmenté par examen du fond d'œil, fondoscopie, c'est-à-dire l'examen de la rétine au travers de la pupille dilatée à l'aide d'un microscope bi-oculaire. La sévérité de la maladie peut être évaluée de façon semi-quantitative par l'attribution d'un score clinique à chaque fond d'œil allant de 1 à 4. Ce score peut décrire l'inflammation du segment postérieur en se basant sur les modifications au niveau du nerf optique, l'inflammation des vaisseaux de la rétine, appelée vasculite, et du tissu rétinien ou bien les

dommages structurels de la rétine selon la localisation de l'inflammation et l'atrophie de la rétine (Xu, Koch et al., 2008). **(Figure 6 et Table 7)** La sévérité de l'EAU peut aussi être évaluée par histopathologie sur des coupes de rétines. Ce système permet de mieux constater les atteintes structurelles de la rétine mais ne permet d'observer la maladie qu'à un seul instant, l'animal devant être euthanasié (Agarwal, Silver et al., 2012).

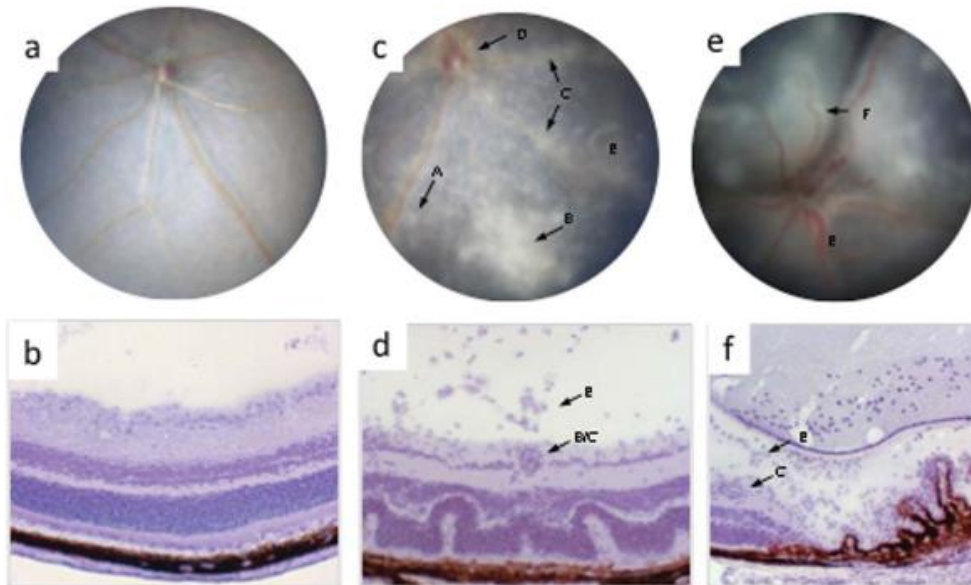


Figure 6 : Apparence clinique et histologique de l'EAU chez la souris, induite par immunisation avec le peptide IRBP₁₋₂₀ émulsifié dans du CFA et par injection intrapéritonéale de toxine pertussique. **(a)** Fond d'œil d'une souris naïve montrant le disque optique et les vaisseaux rétiniens. **(b)** Histologie de la rétine et de la choroïde d'une souris naïve. **(c)** Fond d'œil d'une souris EAU. A : petit infiltrat/granulome, B : granulome large, C : Vasculite, D : œdème papillaire (gonflement du disque optique), E : Haze vitréen. **(d)** Histologie d'une rétine de souris EAU. B/C : vasculite entourée de granulomes, E : Infiltrat cellulaire dans le vitré **(e)** Fond d'œil d'une souris avec une EAU sévère et un décollement rétinien indiqué en F. **(f)** Histologie d'une rétine de souris avec une EAU sévère. Issu de Forrester, Klaska, Yu et Kuffova 2013

Score	Infiltrat	Inflammation du nerf optique	Vaisseaux rétiniens	Dommages structurels
1	1-4 petites lésions ou 1 lésion linéaire	Inflammation minimale	Vaisseaux engorgés sans fuite périvasculaire	Lésions rétiniennes ou atrophie rétinienne <1/4 de la surface
2	5-10 petites lésions ou 2-3 lésions linéaires	Inflammation légère	Vaisseaux engorgés et 1-4 légères fuites périvasculaires	Lésions rétiniennes ou atrophie rétinienne impliquant ¼ à ¾ de la surface de la rétine
3	>10 petites lésions ou >3 lésions linéaires	Inflammation modérée	>4 légères fuites périvasculaires ou 1-3 fuites modérées	Atrophie générale de la rétine avec de multiples petites lésions ou <3 lésions linéaires
4	Lésions linéaires confluentes	Inflammation sévère	>3 fuites périvasculaires modérées ou >1 fuite sévère	Atrophie générale de la rétine avec >3 lésions linéaires ou lésions confluentes

Table 7 : Critères d'attribution du score clinique chez la souris C57Bl/6. Issu de Xu et al., 2008

e) Similarités entre la pathologie humaine et le modèle murin

L'EAU présente de nombreuses ressemblances avec les uvéites humaines (**Figure 7**). On peut noter une désorganisation générale des couches de la rétine. Les lésions incluent la perte des noyaux dans les couches des cellules ganglionnaires et des photorécepteurs, des plis rétiniens, un exsudat sous-rétinien avec une hémorragie sous-rétinienne, une vasculite, des dommages à l'EPR et une inflammation de la choroïde (**Caspi 2006, Caspi 2010**).

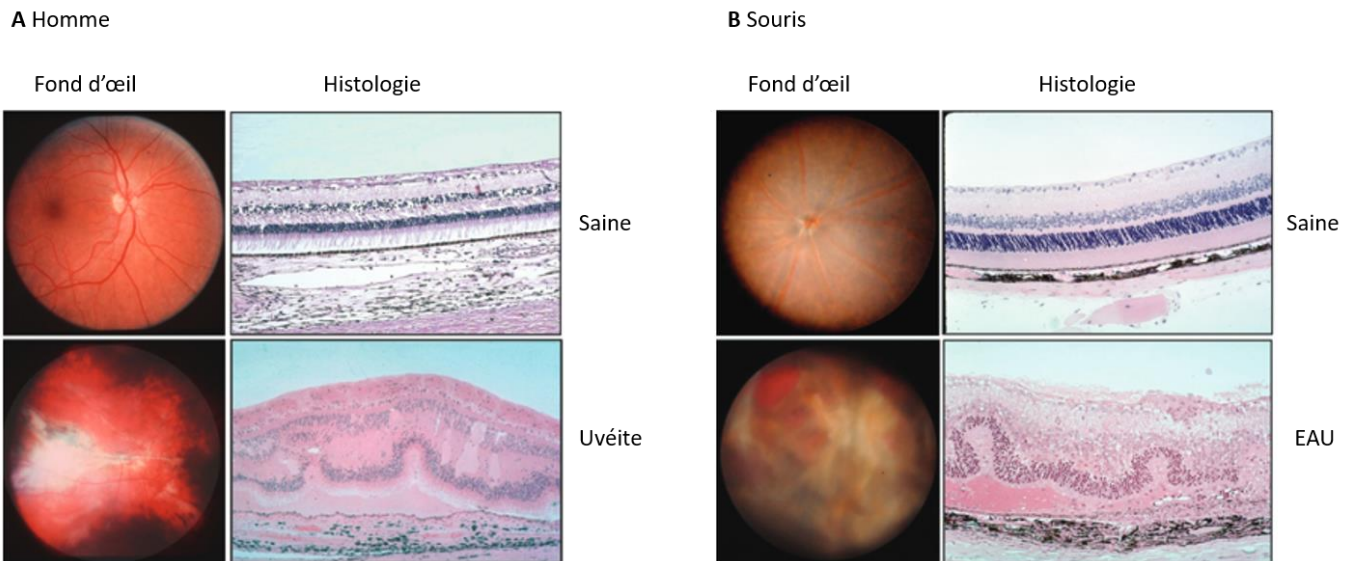


Figure 7 : Apparence clinique et histologique de l'uvéite chez l'homme et la souris. **(A)** Apparence du fond d'œil (segment postérieur de l'œil) et histologie de la rétine (x200) d'une rétine humaine saine ou d'un patient atteint d'uvéite (sarcoïdose oculaire). **(B)** Fond d'œil (x20) et histologie de la rétine (x400) d'une souris B10.RIII immunisée avec le peptide IRBP. Issu de Caspi 2010

3. Pathogénèse de l'uvéite

a) Les lymphocytes T dans l'EAU

Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle central dans l'uvéite. En effet, comme indiqué précédemment, le transfert de lymphocytes T CD4+ purifiés, spécifiques d'antigènes rétiens, induit une EAU chez des animaux receveurs sains (Agarwal et Caspi 2004). Ces observations sont supportées chez l'homme par le succès de plusieurs essais cliniques employant des molécules qui ciblent la voie de synthèse de l'IL-2, cytokine nécessaire à la prolifération et à la survie des lymphocytes T (Kulkarni 2001). Des effets similaires ont été observés dans un essai clinique employant des anticorps monoclonaux ciblant l'IL-2 (Nussenblatt, Fortin et al., 1999). La déplétion des lymphocytes T CD8+ n'a aucun effet ni sur l'initiation ni le développement de l'EAU ce qui suggère qu'ils ne jouent pas un rôle important dans ce modèle (Calder, Zhao et al. 1993).

b) Polarisation des lymphocytes T et EAU

i. Les Th1

Les Th1 sont un sous-type de lymphocytes T CD4+ polarisés par l'IL-12 et l'IFN- γ qui produisent les cytokines IFN- γ et TNF- α . Xu et al., ont montré que des lymphocytes T auto-réactifs spécifiques du peptide IRBP₁₆₁₋₁₈₀, polarisés en Th1 à l'aide de l'IL-12, et produisant de fortes quantités d'IFN- γ étaient hautement uvéitogéniques (Xu et al., 1997). Cependant le rôle de l'IFN- γ dans l'EAU est pendant plusieurs années apparu comme contradictoire, notamment dû à des expériences qui ont montré que

l'IFN- γ a un rôle protecteur ou délétère dans l'EAU. En effet, la neutralisation de l'IFN- γ à l'aide d'anticorps spécifiques ou la délétion du gène *ifng* ne protège pas de l'EAU mais au contraire l'exacerbe (Caspi et al., 1994 ; Jones et al., 1997). Paradoxalement, De façon surprenante, il a aussi été observé que l'IL-12 a un rôle protecteur contre l'EAU. En effet, l'administration d'IL-12 recombinante prévenait le développement de la maladie mais uniquement si celle-ci était injectée au moment de l'immunisation (Tarrant et al., 1999). Cet effet était corrélé avec la présence de forts taux sériques d'IFN- γ ce qui indiquerait que la production précoce d'IFN- γ est protectrice uniquement si celle-ci est précoce (Horai et Caspi., 2011). L'IFN- γ aurait ainsi des rôles différents suivant les phases de l'EAU où il est produit.

ii. Les Th17

Les Th17 sont un sous-type de lymphocytes T CD4+ polarisés grâce aux effets combinés de l'IL-6, du TGF- β , de l'IL-1 β et de l'IL-23, cette dernière étant critique pour leur survie. La présence d'IL-23 joue un rôle important dans le développement de l'EAU, les souris IL-23 KO sont résistantes à l'EAU et les souris traitées avec des anticorps spécifiques de la sous-unité IL-23p19 développent une maladie fortement atténuée (Luger, Silver et al., 2008). D'autre part, une corrélation entre l'IL-23 et les maladies inflammatoires oculaires a été observée dans des uvéites associées avec le syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) (Chi, Yang et al., 2007) et la maladie de Behçet (Chi, Zhu et al., 2008). En effet, dans chacune de ces maladies, des taux élevés d'IL-23 sériques étaient observés chez les patients ayant une uvéite active en comparaison avec les patients ayant une uvéite inactive ou bien sains.

Les cellules Th17 produisent de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-22. Dans le modèle « classique » d'EAU, la neutralisation de l'IL-17 *in vivo* grâce à des anticorps spécifiques améliore significativement la sévérité de la maladie. De plus, le transfert adoptif de lymphocytes T auto-réactifs polarisés en Th17 vers des souris receveuses naïves induit une EAU (Luger, Silver et al., 2008 ; Amadi-Obi et al., 2007 ; Peng et al., 2007). Ces résultats montrent que les Th17 ont la capacité d'être des effecteurs uvéitogéniques. La présence de l'IL-17 dans des yeux de souris immunisées a aussi été observée (Luger, Silver et al., 2008) et la présence de lymphocytes Th17 dans ces yeux a été constatée.

Chez l'homme, des niveaux élevés d'IL-17 sont corrélés avec des uvéites auto-immunes non associées à des maladies systémiques (Amadi-Obi et al., 2007). Cette corrélation est aussi observée dans des uvéites associées à une maladie systémique, notamment le syndrome VKH et la maladie de Behçet (Chi, Yang et al., 2007 ; Chi, Zhu et al., 2008).

iii. Relations entre Th1 et Th17 dans l'EAU

Luger, et al., 2008 ont montré que la pathogénicité de chaque effecteur est indépendante de la présence de l'effecteur réciproque. En effet, le transfert adoptif de lymphocytes polarisés en Th17 issus de souris IFN- γ KO vers des souris receveuses WT ou IFN- γ KO induit l'EAU. L'infiltrat rétinien est différent selon l'effecteur employé. La lignée Th1 induisait le recrutement de cellules à majorité mononucléaire tandis que les Th17 induisait le recrutement de cellules majoritairement granulocytaires (Luger, Silver et al., 2008).

Plusieurs facteurs interviennent dans la polarisation des lymphocytes T effecteurs mais des expériences sur différents modèles animaux montrent que le contexte dans lequel l'antigène rétinien est rencontré et présenté est déterminant. Dans le modèle « classique » d'EAU, induit par immunisation active, la neutralisation de l'IL-17 bloque l'induction de la maladie (Luger, Silver et al., 2008) alors que la neutralisation de l'IFN- γ n'a aucun effet sur le développement de la maladie dans ce modèle. Au contraire, dans le modèle DC-EAU, où l'uvéite auto-immune est induite par l'injection de cellules dendritiques spléniques présentant le peptide uvéitogénique et maturées *in vitro* avec du LPS et des anticorps anti-CD40 (Tang et al., 2007), la réponse immunitaire est dépendante de l'IFN- γ . En effet, les cellules dendritiques uvéitogéniques de souris WT ne peuvent pas induire l'EAU chez des souris receveuses IFN- γ KO (Tang et al., 2007). Le modèle DC-EAU diffère de l'EAU « classique » sur certains points notamment la temporalité de la maladie, qui est plus longue, sa sévérité, qui est atténuée, ainsi que dans l'apparence du fond d'œil (Tang et al., 2007 ; Luger et Caspi, 2008) bien que dans ces deux modèles la réponse immunitaire soit dirigée contre le même antigène. Ainsi, les conditions initiales dans lesquelles l'antigène rétinien est reconnu influent sur le développement de l'EAU. Le microenvironnement inflammatoire pourrait également expliquer la nature hétérogène des uvéites humaines (Luger et Caspi, 2008 ; Caspi 2010).

c) Mécanismes régulateurs dans l'uvéite

L'œil possède un ensemble de mécanismes structurels et moléculaires, appelés privilège immun oculaire, qui lui permettent de contrôler les réponses immunitaires afin de préserver son intégrité, comme cela a été présenté dans le chapitre 1-, (Jerry Y. Niederkorn 2003 ; Gery et Caspi 2018).

Dans le cas d'une inflammation intraoculaire, il apparaît que le privilège immun oculaire n'est plus en capacité de contrôler l'activation de lymphocytes T auto-réactifs en induisant leur conversion en lymphocytes T régulateurs (Gery et Caspi 2018). Caspi et al., ont montré ce phénomène en injectant directement des lymphocytes T CD4+ transgéniques possédant un TCR spécifique d'IRBP dans les yeux d'une souris receveuse naïve. Les résultats de ces expériences montrent que les cellules T naïves acquièrent des fonctions régulatrices ou bien ont leurs fonctions inhibées suite à la reconnaissance

locale de leur antigène. Au contraire, les cellules T qui ont préalablement reconnu leur antigène ne sont pas convertis en Tregs, conservent leurs fonctions et induisent une inflammation sévère (Zhou, Horai et al., 2012). La présence de cellules dendritiques locales serait nécessaire pour la génération de Tregs dans la rétine (McPherson, Heuss et al., 2014).

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont définis selon leur origine. Les Tregs naturelles (nTregs) sont issus du thymus (voir section 4.a). Les Tregs induites (iTregs) se développent à la périphérie à partir de cellules T CD4+ naïves. Elles représentent ensemble 5 à 10 % des cellules TCD4+ circulantes. Elles sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription FoxP3. Les Tregs ont un rôle immunosuppresseur en inhibant les fonctions des cellules T grâce à divers mécanismes : interférence avec les molécules co-stimulatrices des CPA, expression du récepteur à haute affinité de l'IL-2, sécrétion des cytokines immunosuppressives IL-10 et de TGF- β (Immunobiologie de Janeway, 4^e édition, Editions deBoeck, 2018).

Dans le cas où l'inflammation s'est déclarée, les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle crucial dans sa résolution et dans le maintien de la rémission de l'EAU, chez le rat et la souris (Ke, Jiang et al., 2008 ; Silver, Horai et al., 2015). En effet, leur déplétion systémique au pic de la maladie décale la résolution de l'inflammation et leur déplétion après la rémission déclenche une rechute (Silver, Horai et al., 2015). La balance entre T effecteurs et T régulateurs est corrélée avec la résolution de l'inflammation. Il a en effet été observé que, 21 jours après l'immunisation, la fréquence de Tregs atteint 10% des cellules T CD4+ et que ceci est lié avec une résolution rapide de l'inflammation (Ke, Jiang et al., 2008 ; Silver, Horai et al., 2015). La récurrence des uvéites serait potentiellement liée à une diminution des fonctions suppressives de ces lymphocytes T régulateurs (Ke, Jiang et al., 2008). Chez les patients atteints d'uvéite liée au syndrome Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), on observe aussi une réduction de la proportion des lymphocytes T régulateurs à la périphérie ainsi qu'une incapacité de ces lymphocytes à inhiber la prolifération lymphocytaire et la production d'IFN- γ par ces cellules (Chen, Yang et al., 2008).

Les mécanismes impliqués dans la pathogenèse et la résolution de l'EAU sont résumés dans les figures 8 et 9.

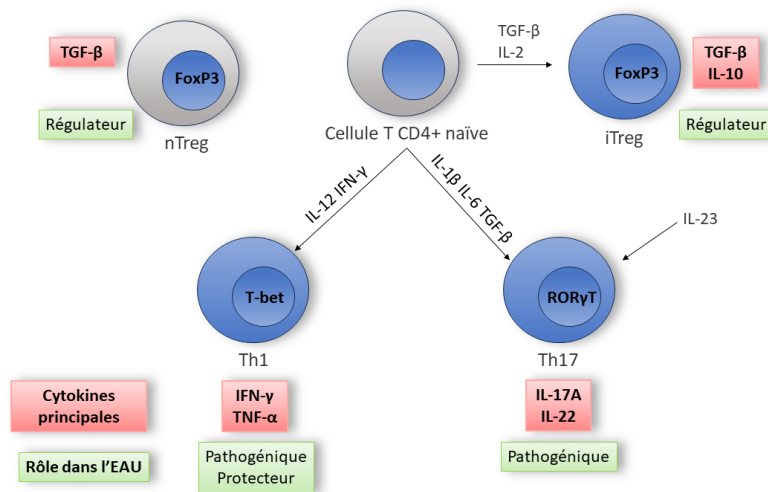


Figure 8 : Rôles des différentes cellules T effectrices ou régulatrices associées à l'EAU.

La polarisation des cellules T CD4+ dépend des signaux donnés par les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et de l'environnement cytokinique. Sous l'action du TGF-β et de l'IL-2, elles se différencient en iTregs, exprimant le facteur de transcription FoxP3, sécrétant du TGF-β et de l'IL-10 et ayant un rôle immunosuppresseur dans l'EAU. Les nTregs sont générés dans le thymus et produisent principalement du TGF-β. L'activation de la cellule T en présence d'IL-12 et d'IFN-γ la polarise en Th1, caractérisé par le facteur de transcription T-bet et la production d'IFN-γ et de TNF-α, ayant un rôle protecteur ou pathogénique dans l'EAU. L'activation de la cellule T en présence d'IL-1β, d'IL-6, de TGF-β et d'IL-23 la polarise en Th17, caractérisé par le facteur de transcription RORγT et par la production d'IL-17A et d'IL22. Ces cellules ont un rôle pathogénique dans l'EAU. Issu de Horai et Caspi 2011.

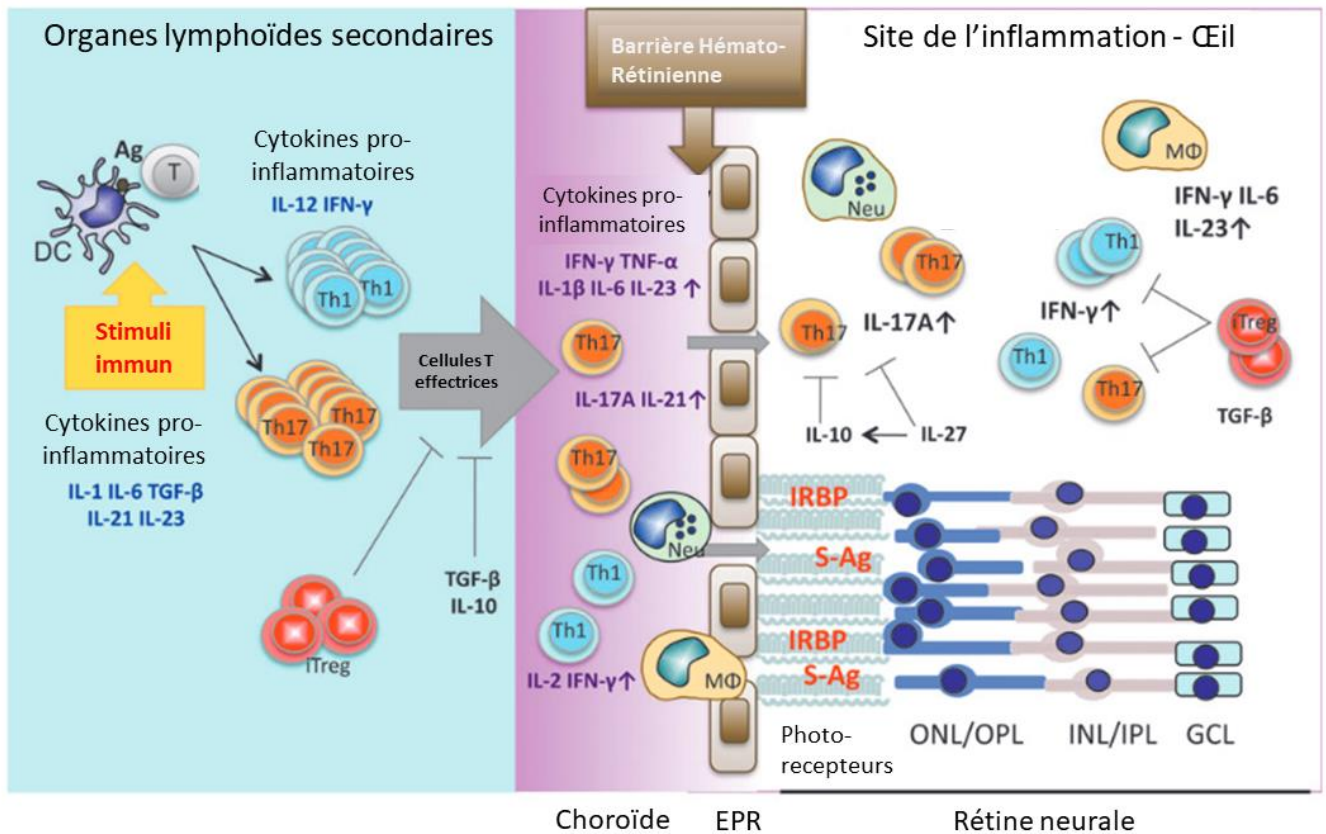


Figure 9 : Pathogenèse de l'EAU.

Des cellules dendritiques présentent un antigène à des cellules T CD4+ auto-réactives à la périphérie en présence de cytokines et d'un stimulus immun induisant leur activation, leur polarisation, en Th1 et/ou Th17, et leur expansion clonale. Ces cellules migrent vers l'œil traversent la barrière hémato-rétinienne et reconnaissent localement leur antigène. Elles sécrètent des cytokines et des chimiokines favorisant le recrutement de nouvelles cellules effectrices depuis la périphérie (macrophages et/ou neutrophiles, lymphocytes T). Issu de Horai et Caspi 2011

b. La microglie dans l'uvéite

Les cellules microgliales activées sécrètent de nombreuses cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α, ...), des chimiokines et des substances neurotoxiques comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'oxyde nitrique (NO). La microglie, au cours de l'uvéite auto-immune, est caractérisée par une activation chronique due à son exposition continue à des stimuli pro-inflammatoires dans l'œil. Dans le modèle EIU (Endotoxin-induced uveitis), où la maladie est induite par injection systémique de LPS (Rosenbaum, McDevitt et al., 1980), la microglie est rapidement activée et migre dans la couche des photorécepteurs après l'injection de LPS (Couturier, Bousquet et al., 2014). Dans l'EAU, l'initiation de la maladie serait due à la microglie. En effet, la déplétion de la microglie avant immunisation prévient le développement de la maladie en bloquant l'entrée des leucocytes par la barrière hémato-rétinienne

(Okunuki, Mukai et al., 2019). Lipski et al., ont également observé que, dans l'EAU, la microglie a des capacités de présentation antigénique (Lipski, Dewispelaere et al., 2017). Elle pourrait donc entretenir l'inflammation en activant des lymphocytes T recrutés depuis la périphérie. Ainsi, la microglie participerait à la progression de la maladie en favorisant la rupture de la barrière hémato-rétinienne et le recrutement de cellules immunitaires depuis la périphérie.

4. Uvéite, tolérance et auto-immunité

La caractérisation d'une uvéite comme non-infectieuse ne signifie pas qu'elle a une origine auto-immune. L'étiologie de cette maladie est encore mal comprise et plusieurs hypothèses quant à son origine sont encore débattues au regard des récentes découvertes (Gery et Caspi 2018 ; Forrester, Kuffova et Dick 2018).

a. Le développement des lymphocytes T

Dans cette partie, je n'aborderai que le développement des lymphocytes T ayant un TCR formé d'une chaîne α et d'une chaîne β . L'intégralité des informations de cette partie sont issues du livre Immunobiologie de Janeway, 4^e édition, Editions deBoeck, 2018.

Les lymphocytes T ont pour origine un progéniteur lymphoïde commun avec les lymphocytes B généré dans la moelle osseuse. Certains de ces progéniteurs migrent dans le thymus et, sous le contrôle de la voie de signalisation Notch, engagent le programme de différenciation en lymphocytes T. On nomme ces cellules les thymocytes. Dans un premier temps, les thymocytes n'expriment aucun des marqueurs caractéristiques des lymphocytes T matures, à savoir CD3, CD4 et CD8, et sont nommées double-négatives. Ce stade double-négatif est caractérisé par quatre phases successives (DN1, DN2, DN3 et DN4), identifiées par des niveaux d'expression différents des récepteurs CD44 et CD25. Au stade DN2 et DN3, les thymocytes réarrangent le locus de leur chaîne β et, si celui-ci est productif, elle s'associe alors avec une chaîne α de substitution formant un pré-TCR associé à CD3. Les thymocytes entrent alors au stade DN4 caractérisé par une prolifération intense et aboutissant à l'expression de CD4 et de CD8. Les thymocytes, caractérisés comme double-positifs, réarrangent le locus de leur chaîne α qui s'associera à la chaîne β pour former un TCR mature. La sélection de ce TCR déterminera l'expression de CD4 ou de CD8. Les lymphocytes T matures simple-positifs seront ensuite exportés à la périphérie.

i. La tolérance centrale

Au cours du développement des lymphocytes T, ceux-ci sont soumis à deux processus de sélection de leur TCR, généré aléatoirement : la sélection positive et la sélection négative.

La sélection positive a lieu au stade double-positif des thymocytes dans le cortex thymique. Les cellules épithéliales du cortex thymique présentent des peptides du soi associés à des molécules du CMH I ou

du CMHII. La survie du thymocyte et sa maturation dépendent de l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide et de l'intensité du signal issu de cette interaction. Un signal de forte intensité induit la survie du thymocyte tandis qu'un signal d'intensité faible ou nulle induit sa mort. La classe du CMH avec lequel interagit le TCR définit le co-récepteur qui sera exprimé en association avec lui. Si les cellules interagissent avec le CMH I, elles exprimeront le co-récepteur CD8 tandis qu'une interaction avec le CMH II induira l'expression de CD4. La sélection positive assure que les lymphocytes T pourront interagir avec des peptides présentés par les cellules présentatrices de l'antigène.

Les lymphocytes T simple-positifs sont par la suite sélectionnés négativement. Ce processus, qualifié de tolérance centrale, permet l'élimination des cellules T auto-réactives capables de s'activer trop fortement suite à la reconnaissance d'un antigène du soi. La sélection négative implique les cellules épithéliales de la medulla du thymus, exprimant des antigènes du soi à leur surface grâce au facteur de transcription AIRE (AutoImmune REgulator), et des cellules dendritiques issues de la moelle osseuse.

Une petite population de cellules sélectionnées positivement et recevant des signaux légèrement plus faibles que ceux induisant une sélection négative se différencient en cellules T régulatrices (Treg).

ii. La tolérance périphérique

La tolérance périphérique est définie par la tolérance acquise par les lymphocytes T matures dans les tissus périphériques. Dans le cas où des cellules T auto-réactives échapperaient à la sélection négative dans le thymus, la tolérance périphérique permet de les maintenir dans un état inactif grâce à différents mécanismes. Le contrôle de la réponse immunitaire fait intervenir les Treg, comme cela a été vu à la **section 4.c**. Dans le cas où la cellule T rencontre l'antigène à la périphérie mais en absence de signaux de costimulation, elle entre dans un état de non-réponse, appelé anergie.

La tolérance centrale et la tolérance périphérique assurent l'élimination des cellules T auto-réactives ainsi que leur maintien dans un état inactivé mais il est possible que des cellules échappent à ces contrôles.

5. Antigènes rétiniens et tolérance

Une maladie ne peut être définie comme auto-immune que si l'auto-antigène contre lequel s'exerce la réponse immunitaire est identifié, qu'une réponse auto-immune analogue est reproduite dans un modèle animal et que celui-ci développe une maladie similaire à celle observée chez l'homme (Rose, Bona et al., 1993 ; Margo et Harman 2016). Plusieurs études montrent que la délétion des cellules T auto-réactives dans le thymus s'applique aux antigènes rétiniens. Des analyses par RT-PCR ont montré que les antigènes rétiniens IRBP et S-Ag sont exprimés, chez l'homme, par les cellules épithéliales de la medulla du thymus sous le contrôle du facteur de transcription AIRE (AutoImmune REgulator)

(Anderson et al., 2002 ; Gotter, Brors et al., 2004). Une autre étude a confirmé l'expression thymique de plusieurs antigènes rétiniens chez l'homme, à savoir S-Ag, IRBP, Recoverine et RPE65, et a montré que leur niveau d'expression était très variable entre les individus (Takase et al., 2005). Chez la souris, la susceptibilité à l'EAU semble corrélée avec le niveau d'expression de certains antigènes rétiniens (IRBP et S-Ag) dans le thymus (Egwuagu, Charukamnoetkanok et al., 1997). De plus, des expériences de transplantations thymiques entre des souris WT et déficientes pour le gène *IRBP* ont montré que les souris n'exprimant pas IRBP dans le thymus développent une maladie très sévère en comparaison à celles l'exprimant (Avichezer et al., 2003). Les souris déficientes pour le gène *AIRE* développent une maladie auto-immune avec une atteinte de multiples organes, dont la rétine (Anderson, Venanzi et al., 2002). DeVoss, et al., 2006 ont confirmé ces résultats et ont montré que dans ce modèle l'uvéïte est induite par une réponse dirigée contre IRBP (DeVoss, Hou et al., 2006). De plus, l'absence d'expression d'IRBP dans le thymus est suffisante pour déclencher une réponse auto-immune dans l'œil (DeVoss, Hou et al., 2006). Une étude a montré la présence de lymphocytes T répondant au S-Ag dans un test de lympho-prolifération chez des individus sains, de 0 à 4 pour 10 millions de PBMC, et des patients atteints d'uvéïte postérieure, de 0 à 200 pour 100 millions de PBMCs (De Smet, Dayan, 1998). Enfin, Lambe et al., 2007 ont développé un modèle de souris double transgénique exprimant un néo-antigène HEL (Hen Egg Lysozyme) dans la rétine, sous le contrôle du promoteur du gène *irbp*, et un TCR transgénique spécifique de cet antigène (TCR-rHEL), afin de suivre le destin des cellules T auto-réactives. Dans ce modèle, les souris développent une uvéïte spontanément un mois après leur naissance. Le croisement de ces souris avec des souris *AIRE*-KO entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes T TCR-rHEL circulant à la périphérie et ces souris développent une uvéïte plus rapidement (Lambe et al., 2007). Ainsi, des lymphocytes T auto-réactifs avec un TCR capable de reconnaître un antigène rétinien échapperaient à la sélection négative dans le thymus et circuleraient à la périphérie.

6. Auto-réactivité et uvéïte

Chez la souris, la préexistence de cellules T régulatrices dérivées du thymus semble définir le seuil de susceptibilité à l'EAU car leur déplétion avec un anticorps anti-CD25 avant immunisation a pour conséquence d'accroître la sévérité de la maladie (Avichezer, Grajewski et al., 2003). Caspi et al., émettent l'hypothèse que les cellules T auto-réactives ayant échappées à la déléition dans le thymus circulent à la périphérie dans un état de non tolérance. En effet, l'œil étant séquestré derrière la barrière hémato-rétinienne, cela limiterait la tolérance périphérique du fait de l'inaccessibilité des antigènes (Caspi 2010 ; Gery et Caspi 2018). Plusieurs études appuient cette hypothèse. Gregerson, et al., 1999 ont développé un modèle de souris exprimant la β -galactosidase sous contrôle du promoteur de la rhodopsine et où l'EAU est induite par immunisation avec la β -galactosidase. Les souris exprimant

la β -gal de manière systémique ne développaient pas de maladie contrairement aux souris l'exprimant uniquement dans la rétine (Gregerson, Torseth et al., 1999). Lambe et al., ont montré dans le modèle double transgénique HEL/TCR-rHEL que l'induction de l'anergie des cellules T TCR-rHEL était déficiente du fait d'une faible présentation de l'antigène HEL à la périphérie, celui-ci étant uniquement exprimé dans la rétine (Lambe et al., 2007). Dans le modèle murin spontané R161H, exprimant un TCR transgénique spécifique d'IRBP₁₆₁₋₁₈₀, les cellules T CD4⁺ circulant à la périphérie ont un phénotype majoritairement naïf (Horai, Silver, Chen et al., 2013).

Les cellules T naïves sont incapables d'induire l'EAU (Fujimoto, Yu et al., 2006 ; Horai, Silver et al., 2013). Elles n'acquiescent des capacités pathogéniques que si elles sont activées *in vitro* en présence du peptide immunisant et de cytokines polarisantes avant d'être transférées. Ces observations suggèrent que, les cellules T auto-réactives sont activées à la périphérie par un stimulus inconnu. Dans le modèle d'EAU active, l'Adjuvant Complet de Freund remplit cette fonction (voir section 2.a). L'une des hypothèses avancées est que ces cellules sont activées par des antigènes dont la structure est proche de celle d'un antigène rétinien (mimétisme antigénique) (Singh, Usukura et al., 1992 ; Wildner et Diedrichs-Möhring 2004 ; Caspi 2010 ; Wildner 2023). En cas de dommages oculaires, des antigènes rétinien pourraient aussi être libérés dans la circulation lymphatique et activer ces cellules T auto-réactives, ce qui est observé dans l'ophtalmie sympathique où une blessure à un œil déclenche une inflammation dans l'œil non endommagé (Nussenblatt, Whitcup et al., 2004).

Forrester avance comme hypothèse qu'une infection latente par *Mycobacterium tuberculosis* pourrait être responsable d'une inflammation intraoculaire. Au lieu d'être éliminée par les cellules myéloïdes, cette bactérie échapperait à la réponse immunitaire et résiderait dans ces cellules. *Mycobacterium tuberculosis* se réactiverait ensuite dans l'uvée, par exemple, ce qui déclencherait une inflammation dans ce tissu. Les antigènes de cette bactérie pourraient aussi interagir avec des cellules T auto-réactives, ce qui rejoint l'hypothèse du mimétisme antigénique (Forrester, Kuffova et Dick., 2018). Un lien entre uvéite auto-immune et microbiote a été mis en évidence dans le modèle murin d'uvéite spontanée R161H. En effet, les souris traitées avec des antibiotiques à large spectre développaient une maladie atténuée et ce résultat a été reproduit chez des souris aseptisées (Horai, Zarate-Blades et al., 2015 ; Horai et Caspi 2019).

Chapitre 3 : Le récepteur P2X7

1) La signalisation purinergique

Le concept de signalisation purinergique désigne le fonctionnement des nucléotides comme molécules de signalisation extracellulaire. Celui-ci a été introduit en 1972 par Geoffrey Burnstock après qu'il ait montré que l'ATP agissait comme neurotransmetteur dans les neurones inhibiteurs non cholinergiques du muscle lisse du taenia coli de cobaye (Burnstock et al., 1970). Ce concept a rencontré une grande hostilité jusqu'au début des années 1990 où les premiers récepteurs ont été clonés. Décrits pour la première fois en 1976 (Burnstock ; 1976), les récepteurs purinergiques ont ensuite été classifiés en deux types selon leurs ligands, à savoir les récepteurs P1, reconnaissant l'adénosine et les récepteurs P2, reconnaissant l'ADP et l'ATP (Burnstock; 1978) En 1985, les récepteurs P2 sont subdivisés en deux types : les récepteurs ionotropiques P2X et les récepteurs métabotropiques P2Y (Burnstock and Kennedy ; 1985). Les sept récepteurs P2X et les huit récepteurs P2Y sont présentés dans les tables 8 et 9 respectivement.

Récepteurs	Expression	Agonistes préférentiels	Transduction du signal
P2X1	Muscle lisse, plaquettes, cervelet, neurones spinaux de la corne dorsale	ATP	Canal ionique spécifique aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺
P2X2	Muscle lisse, SNC, rétine, cellules chromaffines, ganglions autonomes et sensoriels	ATP	Canal ionique spécifique aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺
P2X3	Neurones sensoriels, NTS, quelques neurones sympathiques	ATP	Canal ionique spécifique aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺
P2X4	CNS, testicules, colon	ATP	Canal ionique spécifique aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺
P2X5	Cellules en prolifération dans la peau, intestin, vessie, thymus et moelle épinière	ATP	Canal ionique spécifique aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺
P2X6	SNC, motoneurones de la	ATP	Canal ionique spécifique

	moelle épinière		aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺
P2X7	Cellules immunitaires, pancréas, peau	ATP	Canal ionique spécifique aux cations Ca ²⁺ et Na ⁺ Formation d'un macropore suite à une stimulation prolongée

Table 8: Récepteurs P2X d'après Burnstock and Knight 2004

Récepteur	Expression	Agonistes	Transduction du signal
P2Y1	Cellules endothéliales et épithéliales, plaquettes, cellules immunitaires, ostéoclastes	ADP, ATP	Protéine Gq/G11 ; activation de la PLCβ
P2Y2	Cellules immunitaires, cellules épithéliales et endothéliales, tubules rénaux, ostéoclastes	UTP, ATP	Protéine Gq/G11 ; activation de la PLCβ
P2Y4	Cellules endothéliales	UTP, ATP	Protéine Gq/G11 ; activation de la PLCβ
P2Y6	Cellules épithéliales, placenta, cellules T, thymus	UDP, UTP	Protéine Gq/G11 ; activation de la PLCβ
P2Y11	Rate, intestin, granulocytes	ATP	Protéine Gq/G11 et Gs ; activation de la PLCβ
P2Y12	Plaquettes, cellules gliales	ADP	Protéine Gi ; inhibition de l'adénylate cyclase
P2Y13	Rate, cerveau, ganglions lymphatiques, moelle osseuse	ADP	Gi

P2Y14	Placenta, tissu adipeux, estomac, intestin, quelques régions du cerveau	UDP-glucose	Gi/o
--------------	---	-------------	------

Table 9: Récepteurs P2Y d'après Burnstock and Knight 2004

a) Les récepteurs P1

Les récepteurs P1 sont des récepteurs métabotropes, couplés à des protéines G et activés par l'adénosine extracellulaire. Ils sont classifiés en quatre sous-types : A1, A2A, A2B et A3. Ils sont caractérisés par une forte (A1, A2A, A3) ou une faible affinité à l'AMP ainsi que par des couplages différents aux protéines G. Les récepteurs A1 et A3 sont préférentiellement couplés à une protéine Gi, inhibant l'activité de l'adénylate cyclase tandis que les récepteurs A2A et A2B sont couplés à une protéine Gs, ce qui stimule l'activité de l'adénylate cyclase induisant une augmentation de la quantité d'AMP cyclique intracellulaire. Dans plusieurs systèmes cellulaires, les récepteurs A2B et A3 sont couplés à une protéine Gq et le récepteur A1 est couplé à une protéine Go ce qui induit l'activation de la phospholipase C et la mobilisation du calcium intracellulaire. Ces récepteurs sont largement exprimés par les cellules nerveuses, immunitaires et cardiovasculaires (Pelegrín ; 2020) et participent à la régulation des fonctions cardiaques (Funakoshi et al., 2006), immunitaires (Belikoff et al., 2011) et rénales (Johansson et al., 2001).

b) Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs métabotropes couplés à des protéines G, divisés en huit sous-types chez l'homme : P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14. La structure de ces récepteurs est typique des récepteurs couplés à des protéines G avec sept domaines transmembranaires, une extrémité NH2 extracellulaire et une extrémité COOH intracellulaire. Les récepteurs P2Y peuvent reconnaître de nombreux nucléotides extracellulaires avec des sensibilités variées. P2Y1, P2Y12 et P2Y13 ont pour ligand principal l'ADP ; P2Y4 est activé par l'UTP ; P2Y6 par l'UDP ; P2Y2 par l'UTP et l'ATP. P2Y14 est activé par l'UDP, l'UDP-glucose et l'UDP-galactose et P2Y11 est uniquement activé par l'ATP (Burnstock 2007). Deux sous-groupes au sein des récepteurs P2Y ont été définis d'après des homologies de séquence dans le TM7 et selon les voies de signalisation intracellulaires induites (Abbracchio et al., 2006). P2Y1, P2Y2, P2Y4 et P2Y6 sont couplés à la protéine Gq/11 et activent la phospholipase C-β permettant la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la PKC. En plus de la protéine Gq/11, P2Y11 est couplé à la protéine Gs ce qui induit l'activation de l'adénylate cyclase. Le deuxième sous-groupe est composé des récepteurs P2Y12, P2Y13 et P2Y14 qui

sont eux couplé à la protéine Gi/o, ce qui inhibe l'adénylate cyclase et diminue ainsi la concentration en AMPc.

c) Les récepteurs P2X

Les récepteurs ionotropiques P2X sont des canaux ioniques dépendants de l'ATP, constitués de trois sous-unités transmembranaires, perméables aux ions sodium, potassium et calcium. Ces récepteurs sont divisés en sept membres (P2X1 à P2X7) et se distinguent notamment par leur sensibilité à l'ATP, leur cinétique d'activation et leur profil de désensibilisation (Jarvis et al., 2009). Structurellement, chaque sous-unité varie en taille (de 388 acides aminés pour P2X4 à 595 acides aminés pour P2X7) et est constituée de deux domaines hydrophobes transmembranaires (TM1 et TM2) séparés par une large boucle extracellulaire. Celle-ci contient dix résidus cystéines, conservés parmi ces récepteurs, qui forment une série de cinq ponts disulfures (North., 2002). Les extrémités N-Ter et C-Ter sont intracellulaires. Les sites de fixation de l'ATP sont localisés à l'interface entre deux sous-unités et la fixation de trois molécules d'ATP est nécessaire pour induire l'activation du récepteur (Jiang et al., 2003). P2X7 possède la plus faible sensibilité à l'ATP ($EC_{50} = 2-4 \text{ mM}$) et se désensibilise lentement (supérieur à 20 secondes). La concentration d'ATP requise pour l'activation des autres récepteurs P2X est de l'ordre du μM (P2X1 : $EC_{50} = 0,1-0,7 \mu\text{M}$) ; P2X2 : $EC_{50} = 2-8 \mu\text{M}$; P2X3 : $EC_{50} = 1 \mu\text{M}$; P2X4 : $EC_{50} = 1-10 \mu\text{M}$) (Pelegrín et al., 2020).

2) Structure et expression de P2X7

a) Structure de P2X7

Le récepteur P2X7 fut initialement séparé des autres récepteurs purinergiques, et nommé P2Z, du fait des fortes quantités d'ATP nécessaires à son activation ($\sim 100 \mu\text{M}$) et caractérisé comme responsable de la perméabilisation et de la lyse des macrophages en réponse à l'ATP (Gordon., 1986). Le premier clonage de ce récepteur chez le rat et la comparaison de sa séquence en acides aminés avec celles des autres récepteurs P2X a montré leur similitude et a permis sa classification en tant que P2X7 (Surprenant et al. 1996). Le gène codant pour P2X7 a été identifié chez 55 espèces différentes tandis que le récepteur a été caractérisé chez 6 mammifères, outre l'Homme (Macaque, Chien, Panda, Souris, Rat, Cobaye) ainsi que chez d'autres espèces non-mammifères, comme le Poisson-zèbre. Le gène codant pour P2X7 est composé de 13 exons et est localisé, chez l'homme, sur le chromosome 12 (Buell et al., 1998). Le récepteur P2X7 de la souris est homologue à 81 % avec celui de l'homme et son gène est présent sur le chromosome 5 (Sluyter 2017). P2X7 est constituée de 595 acides aminés et structurée en deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), rejoints par une large boucle extracellulaire contenant deux sites de fixation de l'ATP et deux extrémités intracellulaires N-Ter et C-ter (Jiang et al., 2013). Les domaines transmembranaires sont des hélices alpha et le domaine extracellulaire contient

14 feuillets Beta et 4 hélices alpha. Le cristal du récepteur P2X7 de panda géant a été obtenu en 2016 par Karazawa et Kawate et a montré la structure trimérique du récepteur ainsi que des ressemblances de structure avec celles du récepteur P2X4 du poisson-zèbre (Hattori et Gouaux., 2012) et du récepteur P2X3 de l'homme (Mansoor et al., 2016). La structure tri-dimensionnelle d'un monomère de P2X7 est analogue à la forme d'un dauphin où la boucle extracellulaire constitue la tête, le corps, la nageoire dorsale et les nageoires pectorales et les domaines transmembranaires et les extrémités N-Ter et C-Ter représentent la queue et la nageoire caudale (**Figure 10**). La juxtaposition de chacun des sites de fixation de l'ATP forme au total trois poches de liaison de l'ATP sur le récepteur trimérique qui nécessite la fixation de trois molécules d'ATP pour s'activer (Hattori et al., 2012). L'extrémité C-Ter est nécessaire pour l'expression et la fonction du récepteur. Elle se distingue de celle des autres récepteurs P2X de par sa taille qui est de 200 acides aminés plus grande (Costa-Junior et al., 2011). Elle présente également des motifs uniques notamment un domaine riche en cystéines (Chaumont et al., 2004) et un domaine de liaison du lipopolysaccharide (Denlinger et al., 2001). L'extrémité N-Ter régule le flux de calcium au travers du canal (Liang et al., 2015) ainsi que l'activation des kinases ERK1 et ERK2 (Armstrup et Novak., 2003).

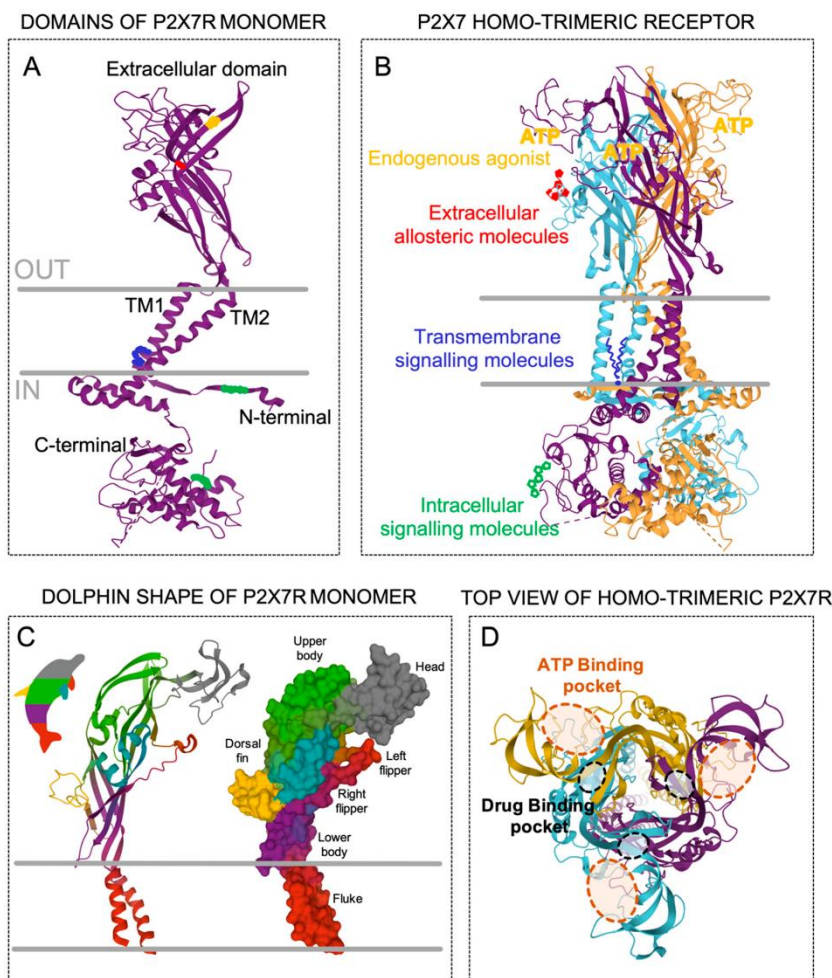


Figure 10 : Structure du récepteur P2X7. (A) Structure secondaire d'un monomère du récepteur P2X7 et de ses cinq domaines : extracellulaire, transmembranaires (TM1 et TM2), intracellulaires (C-Ter et N-Ter). (B) Assemblage de trois monomères de P2X7 formant le récepteur fonctionnel. Les trois sites de fixation de l'ATP sont indiqués en jaune dans le domaine extracellulaire. (C) Ressemblance entre la structure d'un monomère de P2X7 et le corps d'un dauphin. (D) Vue de dessus de trois monomères de P2X7 assemblés avec les trois sites de fixation de l'ATP (en jaune) et les trois poches liant des médicaments (en pointillés noirs). Issue de Martinez-Cuesta, Blanch-Ruiz et al., 2020

b) Distribution tissulaire et cellulaire

P2X7 est principalement exprimé par les cellules immunitaires de la lignée myéloïde, à savoir les macrophages, les cellules dendritiques, les monocytes, les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles. P2X7 est aussi exprimé par les lymphocytes T (Burnstock and Knight 2004).

L'expression de P2X7 par les neurones est un intense sujet de débat (Illes et al., 2017 ; Miras-Portugal et al., 2017 ; Kaczmarek-Hajek et al., 2018 ; Habbas et al., 2011). Une analyse par hybridation in situ a montré la présence de l'ARNm de P2X7 dans les neurones, les oligodendrocytes et la microglie dans le cerveau de rat (Yu et al., 2008). Dans le système nerveux central (CNS), l'ARNm de P2X7 a été observée au niveau des neurones pyramidaux glutamatergiques de la région CA3 (Corne d'Ammon) de l'hippocampe ainsi que de la microglie, des astrocytes et des oligodendrocytes dans le cerveau (Metzger et al., 2017). Ces résultats ont été confirmés par Martin et al., chez la souris C57Bl6/J (Martin et al., 2019). P2X7 est aussi exprimé par les cellules de Bergmann dans le cervelet (Habbas et al., 2011).

Récemment, une étude réalisée par Kaczmarek et al., a montré, à l'aide d'une lignée de souris transgénique surexprimant une protéine P2X7 fusionnée à l'eGFP, que P2X7 était principalement exprimé, en conditions physiologiques, par la microglie, les oligodendrocytes et les cellules de Bergmann mais aucunement par les neurones. Dans la rétine, P2X7 était exclusivement exprimé par la microglie. (Kaczmarek et al., 2018). Erica L. Fletcher et al., ont observé des résultats similaires avec des analyses par immunofluorescence sur des rétines de souris CX3CR1-GFP/+ (Erica L. Fletcher et al., 2019).

3) Fonctions de P2X7

a. Activation de l'inflammasome NLRP3

Les récepteurs de type NOD (NLR, NOD-like receptors) sont des PRRs (Pathogen-recognition receptors) cytosoliques reconnaissant des produits microbiens (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou des molécules libérées en cas de stress ou par des cellules endommagées (DAMPs, Danger-Associated Molecular Pattern).

Au sein des NLRs, une sous-famille de protéines appelées NLRP, présente la capacité de former des complexes protéiques multimériques impliqués dans la maturation et la libération de cytokines pro-inflammatoires nommés inflammasomes. L'inflammasome constitué de la protéine NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) est le mieux caractérisé.

La protéine NLRP3 est structurée en trois parties : un domaine PYD (domaine pyrine) N-terminal, un domaine central NOD/NACHT (domaine de liaison aux nucléotides et d'oligomérisation) et un domaine LRR (leucine-rich repeat) C-terminal. Le domaine PYD de NLRP3 s'associe avec le domaine PYD de la protéine adaptatrice ASC (PYCARD) (Apoptosis associated speck like protein) qui à son tour se lie avec la procaspase-1, par interactions homotypiques entre leurs domaines CARD ce qui mène à son clivage auto-catalytique en sa forme active. La caspase-1 activée peut alors cliver les cytokines pro-IL-1 β et IL-18 en leurs formes actives (Schroder et Tschopp., 2010 ; Xu et al., 2024).

L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 peut être induit par plusieurs signaux différents : des PAMPs dérivés de bactéries, des ARNs viraux, des DAMPs comme l'ATP, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), des polluants comme la silice ou encore les radiations UV (Kim et al., 2016). L'efflux de K⁺ est un événement commun à l'ensemble de ces signaux et est suffisant pour induire l'assemblage de l'inflammasome (Muñoz-Planillo et al., 2013). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore élucidés mais il semblerait que la protéine NEK7 (never in mitosis gene a) en s'associant avec le domaine LRR de NLRP3 agirait comme un senseur de K⁺ (He et al., 2016 ; Shi et al., 2016).

Le rôle de P2X7 dans l'activation de l'inflammasome, la maturation et la libération de l'IL-1 β et de l'IL-18 a été clairement montré (Ferrari et al., 1997 ; Solle et al., 2001 ; Ferrari et al., 2006). Sur la base de ces observations, un modèle à deux signaux, ou "voie canonique" a été proposé (Di Virgilio et al., 2017). Le premier signal, appelé "priming", repose sur l'activation de la voie NF- κ B suite à la stimulation d'un récepteur de la voie des TLRs ou d'un récepteur aux cytokines. L'activation de cette voie mène à la transcription des gènes de la pro-IL-1 β et de NLRP3 et à leur accumulation dans le cytoplasme. La pro-IL-18, elle, est constitutivement exprimée. Le deuxième signal englobe l'ensemble des différents signaux présentés précédemment qui mènent à un efflux de K⁺, à l'assemblage des composants de l'inflammasome, l'activation de la caspase-1 et finalement la maturation des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 11**). Cependant, il semblerait que l'efflux de K⁺ par le récepteur P2X7 ne serait pas suffisant pour activer l'inflammasome et que sa synergie avec le canal TWIK2 (Two-pore domain Weak Inwardly rectifying K⁺ channel) de la famille des récepteurs K2P (two-pore domain K⁺ channel) serait nécessaire (Di et al., 2018). En outre, la caspase-1 est capable de cliver le domaine C-Terminal auto-inhibiteur de la Gasdermine D (GSDMD), libérant ainsi son extrémité N-Terminale. Le domaine N-Terminal de la GSDMD s'insère dans la membrane plasmique et s'oligomérisent pour former des pores

transmembranaires permettant la libération des cytokines IL-1 β et IL-18 et menant à une forme de mort cellulaire appelée pyroptose (Ding et al., 2016 ; Liu et al., 2016 ; Sborgi et al., 2016).

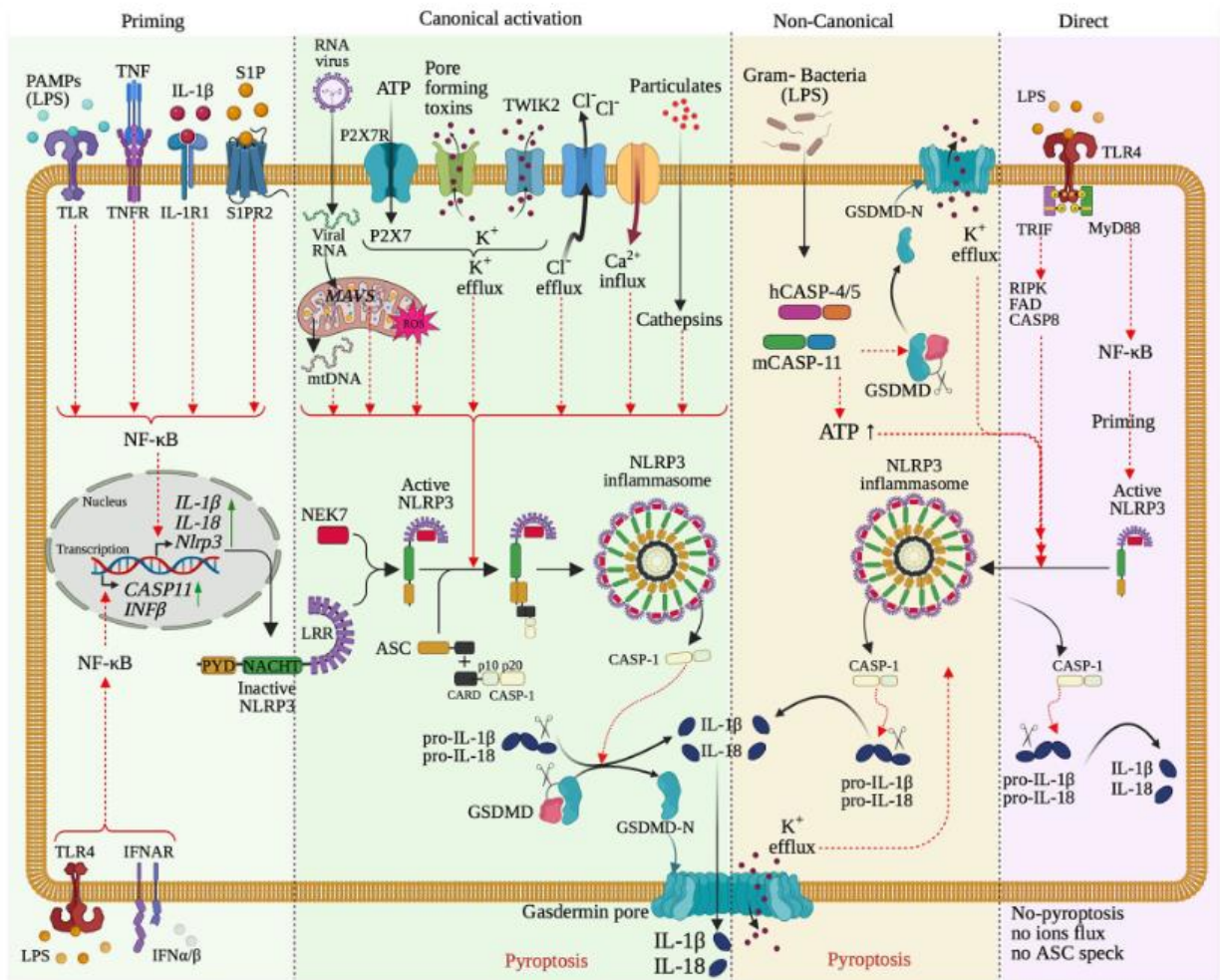


Figure 11 : Voies d'activation de l'inflammasome NLRP3

La voie d'activation canonique de l'inflammasome NLRP3 implique deux étapes : une étape d'amorçage (signal 1, panneau de gauche) et une étape d'activation (signal 2, deuxième panneau en partant de la gauche). L'étape d'amorçage est induite suite à la reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs par des PRRs ce qui mène à l'activation de la voie NF- κ B et la transcription des gènes de *Nlrp3* et de la *pro-IL-18*. La pro-IL-18 est constitutivement exprimée. L'étape d'activation conduit à l'oligomérisation des protéines NLRP3, le recrutement d'ASC et des pro-caspase-1. L'efflux de K⁺ à travers le récepteur P2X7 et le canal TWIK2 contribue à l'activation de l'inflammasome. Le clivage auto-catalytique de la pro-caspase-1 libère sa forme active qui clive alors les pro-IL-1 β et pro-IL-18 en cytokines matures IL-1 β et IL-18. Le clivage du domaine C-Ter de la Gasdermine D libère son domaine N-Ter qui forme des pores membranaires et conduit à la pyroptose. Issue de Xu et al., 2024

b. Phagocytose

P2X7 est principalement connu pour sa capacité à activer des voies de signalisation pro-inflammatoires en présence de son ligand, l'ATP. Cependant, en absence d'ATP et de sérum, il a été montré que P2X7 pouvait agir comme un récepteur scavenger et participer à la phagocytose de cellules apoptotiques (Gu et al., 2011, Gu et al., 2012, Ben J Gu and James Wiley., 2018). Cet effet a été observé sur des macrophages péritonéaux murins ainsi que sur des monocytes, des macrophages et des cellules microgliales humaines (Gu et al., 2010, Gu et al., 2011, Janks et al., 2018). De manière intéressante, il a été montré que la pré-incubation de macrophages humains avec un agoniste de P2X7, l'ATP (0,2-1mM) ou le BzATP (0,1mM), ou un antagoniste de P2X7, l'oATP (0,3mM), inhibait la phagocytose de lymphocytes et de cellules neuronales apoptotiques (Gu et al., 2011). Parallèlement, le rôle central du complexe formé entre P2X7 et la protéine de liaison à l'actine non-muscle myosin IIA (NMMHC-IIA) dans la phagocytose a été décrit (Gu et al., 2010). En absence d'ATP, P2X7 serait ancré au cytosquelette d'actine par la NMMHC-IIA ce qui permettrait la phagocytose de particules. Suite à la liaison de l'ATP au récepteur P2X7, la NMMHC-IIA serait dissociée entraînant une perte de la capacité de phagocytose (Gu et al., 2009, Ben J Gu and James Wiley., 2018). Ainsi l'ATP jouerait à la fois le rôle d'agoniste de voies de signalisation pro-inflammatoires et d'antagoniste de la phagocytose induite par un même récepteur (Ben J Gu and James Wiley., 2018).

c. Rôle de P2X sur les cellules dendritiques

Une étude a montré que la libération d'ATP par des cellules tumorales mourantes agissait sur le récepteur P2X7 des cellules dendritiques entraînant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 β . Cette dernière était requise pour l'activation de lymphocytes T CD8⁺ producteurs d'IFN- γ (Ghiringhelli et al., 2009). De même, dans un modèle de co-culture de cellules dendritiques avec des cellules tumorales, il a été montré que l'absence de P2X7 réduisait grandement la sécrétion d'IL-1 β par ces cellules (Adinolfi et al., 2014). Des travaux ont également montré l'implication de l'ATP dans la maturation des cellules dendritiques. Notamment, la stimulation *in vitro* de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse avec de l'ATP (10 μ M) entraîne une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86. Ces observations sont confortées par des expériences *in vivo* où l'ATP est déplété par un traitement à l'apyrase. En effet, les cellules CD11c⁺ des ganglions lymphatiques des souris traitées expriment moins les molécules CD80 et CD86 (Wilhem et al., 2010).

d. Rôles de P2X7 sur les lymphocytes T

P2X7 est impliqué dans l'activation des lymphocytes T naïfs suite à la reconnaissance antigénique. La transduction du signal issu de la stimulation du TCR entraîne la libération d'ATP au niveau de la synapse immunitaire, par les canaux de la pannexine-1 (Schenk et al., 2008), qui agit alors de façon autocrine sur le récepteur P2X7. L'influx de calcium qui en résulte est essentiel pour l'activation des lymphocytes T car il conduit à l'activation du facteur de transcription NFAT (activated T cell nuclear factor) et à une augmentation de la transcription du gène de l'IL-2 (Yip et al., 2009). P2X7 jouerait aussi un rôle dans la migration des lymphocytes T depuis les ganglions lymphatiques vers les tissus inflammés. Il a été montré que la stimulation de P2X7 entraînait le clivage de la L-Selectine (CD62L), une molécule d'adhésion cellulaire impliquée dans l'orientation des lymphocytes vers les tissus lymphoïdes et les sites d'inflammation (Arbonés et al., 1994 ; Galkina et al., 2003), suite à l'activation des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 (Le Gall et al., 2009). Il a aussi été montré que P2X7 serait impliqué dans la modulation de la stabilité des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Les auteurs ont en effet montré que l'IL-6 augmentait la libération d'ATP par les Tregs, activant de manière autocrine P2X7 ce qui augmentait la phosphorylation d'ERK. La stimulation prolongée de P2X7 par l'ATP ou par ADP-ribosylation mène à la mort des cellules T (Seman et al., 2003 ; Haag et al., 2007). Plusieurs études ont montré que l'expression de P2X7 était la plus importante sur les Tregs et que ceux-ci étaient les plus sensibles à la mort cellulaire induite par l'ATP ou le NAD⁺ *in vitro* (Safya et al., 2018 ; Schenk et al., 2011 ; Hubert et al., 2010). L'induction de l'expression des ecto-enzymes CD39 et CD73 sur les Tregs empêcherait la mort cellulaire induite par l'ATP grâce à la conversion de l'ATP en adénosine (Deaglio et al., 2007 ; Vignali et al., 2008). Ce mécanisme pourrait ainsi favoriser leur survie dans les tissus inflammés en réduisant l'activation de P2X7. Schenk et al., ont également observé que la libération d'ATP par les Tregs entraînait une diminution de l'expression de la protéine FoxP3 suite à l'activation de manière autocrine de P2X7 favorisant ainsi la conversion de ces cellules en Th17 (Schenk et al., 2011). Plusieurs travaux montrent également que P2X7 est impliqué dans la polarisation des lymphocytes T vers le phénotype Th17. Dans un modèle de transplantation d'îlots pancréatiques murins, le traitement avec l'antagoniste de P2X7 oATP induit une diminution de la proportion de lymphocytes Th17 chez les souris receveuses, une réduction de la production d'IL-6 et favorise la survie de la greffe (Vergani et al., 2013). Des observations similaires ont été faites dans un modèle de transplantation cardiaque. En effet, le traitement des souris receveuses avec l'oATP réduisait le nombre de lymphocytes Th17 sept jours après transplantation (Vergani et al., 2012). Une étude menée chez des patients atteints de myasthénie auto-immune a montré que le niveau d'expression de P2X7 par les PBMCs était corrélé avec la sévérité de la maladie ainsi qu'avec les niveaux sériques des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17 et IL-21 connues pour

favoriser la polarisation des lymphocytes T vers le phénotype Th17 (Zhang et al., 2017). Il a aussi été montré que l'ATP activait un sous-type de DCs de la lamina propria intestinale ce qui entraînait la production d'IL-6, d'IL-23 et l'expression des intégrines αV et $\beta 8$, impliquées dans l'activation du TGF- β , menant à la différenciation des lymphocytes T vers le phénotype Th17 (Atarashi et al., 2008).

4) Fonctions de P2X7 dans les maladies neuro-inflammatoires et auto-immunes

a. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative associée à des pertes irréversibles des fonctions cognitives et à une dégradation de la mémoire. Etiologiquement, cette maladie est liée à l'accumulation intracellulaire de protéines Tau hyperphosphorylées sous forme d'enchevêtrements neurofibrillaires et l'agrégation de peptides amyloïdes β sous forme de plaques séniles dans l'hippocampe et le néocortex du SNC (Lebouvier, Pasquier et Buée 2017).

Une augmentation de l'expression de P2X7 est observée dans le cerveau de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Notamment, des analyses immunohistochimiques sur des coupes de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer ont montré une augmentation de l'expression de P2X7 près des plaques amyloïdes en co-localisation avec la microglie activée (McLarnon et al., 2006). Ces résultats ont par la suite été confirmés par Martin et al., qui ont également rapporté l'expression de P2X7 par les cellules microgliales et les astrocytes de cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Martin et al., 2019). De même, P2X7 était co-localisé avec la microglie activée dans un modèle de rat de la maladie d'Alzheimer induit par injection intrahippocampale de peptides amyloïdes- β (McLarnon et al., 2006). Des résultats identiques ont été observés dans le modèle de souris transgénique Tg2576 exprimant une protéine APP humaine mutée. Dans ce modèle, l'expression de P2X7 est augmentée dans l'hippocampe. De plus, P2X7 est exprimé dans des zones avec une forte densité de plaques amyloïdes- β et est co-localisé avec la microglie activée (Parvathenani et al., 2003). Dans le modèle murin de la maladie d'Alzheimer APPPS1, Martin et al., ont observé une importante expression de l'ARNm de P2X7 dans la région CA3 (*Corne d'Ammon*) de l'hippocampe et le cortex de ces souris en comparaison aux souris WT. L'expression de P2X7 par la microglie et les astrocytes a aussi été confirmée dans ce modèle murin (Martin et al., 2019). Plus récemment, Di Lauro et al., ont montré que l'expression de l'ARNm de P2X7 et la production de la protéine P2X7 étaient augmentées sur des nécropsies d'hippocampes issues de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Di Lauro et al., 2022). Les peptides amyloïdes- β présents dans les plaques séniles de patients MA sont issus du clivage de l'APP (Amyloid Precursor Protein) par les β - et γ -sécrétases. Le clivage protéolytique de l'APP par l' α -sécrétase mène à la libération du fragment soluble de l'APP, sAPP α , qui possède des propriétés neuroprotectrices. En utilisant des neuroblastomes humains et murins ainsi que des cellules gliales

primaires, Delarasse et al., ont montré qu'une brève stimulation de P2X7 avec de l'ATP ou du BzATP déclenche le clivage de l'APP par l' α -sécrétase, entraînant une augmentation de la quantité de sAPP α et une diminution des niveaux de peptides A β (Delarasse et al., 2011). A l'opposé de ces résultats, Leon-Otegui et al., ont montré que l'activité de l' α -sécrétase était réduite dans les cellules Neuro-2a après une stimulation prolongée de P2X7 avec du BzATP résultant en la production de peptides A β (Leon-Otegui et al., 2011). Dans le modèle de souris J20, une diminution du nombre de plaques amyloïdes dans l'hippocampe a été observée après l'inhibition de P2X7 par l'antagoniste Blue Brilliant G (BBG). Celle-ci était corrélée avec une diminution de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) augmentant l'activation de l' α -sécrétase (Diaz-Hernandez et al., 2012). De plus, l'absence de P2X7 dans le modèle APPPS1 entraîne une réduction de la charge de plaques amyloïdes et du niveau de peptides A β (Martin et al., 2019). Ainsi, une brève activation de P2X7 pourrait activer l' α -sécrétase et la libération de sAPP α tandis qu'une activation chronique de P2X7 pourrait favoriser la production de peptides A β .

P2X7 joue un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les souris knock-out pour NLRP3 ou la caspase-1 présentent une atténuation globale des symptômes de la MA et une amélioration de l'élimination des peptides A β (Heneka et al., 2013b). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que P2X7 contribue à la neuro-inflammation dans la MA en activant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Il a été montré que P2X7 est impliqué dans la réponse de la microglie aux peptides A β . En effet, la sécrétion d'IL-1 β , induite par les peptides A β , dans des cultures primaires de microglie est abolie en présence d'oATP, un inhibiteur de P2X7 (Rampe et al., 2004). En accord avec ces observations, la microglie de souris P2X7^{-/-} était incapable de libérer de l'IL-1 β en réponse aux peptides A β (Sanz et al., 2009). De plus, une augmentation de la production d'IL-1 β était observée dans le cerveau de souris WT après injection intrahippocampale de peptides A β mais non chez les souris P2X7 KO (Sanz et al., 2009). Cependant, dans le modèle murin de la MA, APPPS1, Martin et al., ont montré que la perte de P2X7 n'affectait pas la libération d'IL-1 β dans le cerveau (Martin et al., 2019). En effet, l'absence de P2X7 réduisait les niveaux des chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 dans le cerveau. Cet effet était associé avec une diminution prononcée du nombre de cellules T CD8⁺ dans l'hippocampe et le plexus choroïde (Martin et al., 2019).

P2X7 peut aussi contribuer à la propagation de la neuro-inflammation dans la MA en augmentant la production de ROS. Notamment, une co-localisation de la sous-unité gp91phox de la NADPH oxydase avec la microglie P2X7-positif a été observée dans le cerveau de souris APPPS1. D'ailleurs, de plus nombreux dommages neuronaux ont été observés dans les régions P2X7-positif du cortex cérébral suggérant que P2X7 pourrait induire des dommages neuronaux par la production de ROS (Lee et al., 2011).

P2X7 semble être impliqué dans des tauopathies autres que la MA et contribuer à la neuro-inflammation dans ces pathologies. Par exemple, une surexpression de P2X7 a été observée dans le

cortex de patients affectés par différentes tauopathies, à savoir, la dégénérescence frontotemporale (FTLD), la maladie de Pick et la paralysie supranucléaire progressive (Carvalho et al., 2021). Des analyses immunohistochimiques de cerveaux de patients FTLD ont révélé que l'expression de P2X7 était augmentée sur les astrocytes et la microglie. De même, des quantités élevées d'ARNm de P2X7 et protéine P2X7 ont été observées dans l'hippocampe du modèle murin de tauopathie Thy-Tau22. Dans ce modèle, la délétion de P2X7 réduit l'expression de marqueurs inflammatoires connues pour être associés avec les pathologies Tau chez la souris. Par ailleurs, les déficits mémoriels et de plasticité synaptique observés dans ce modèle étaient atténués en absence de P2X7 (Cervalho et al., 2021). Une étude récente publiée par Di Lauro et al., supporte ces découvertes. En utilisant le modèle murin de tauopathie P301S, ce groupe a observé une expression accrue de P2X7 dans l'hippocampe de ces souris au niveau transcriptionnel et traductionnel. De plus, les déficits cognitifs étaient atténués après un traitement avec l'inhibiteur de P2X7 GSK 1482160A. Cet effet était associé avec une augmentation des capacités de phagocytose de la microglie et une diminution de la production d'IL-1 β . De façon intéressante, la phosphorylation de la protéine tau était diminuée après le blocage de P2X7. Cet effet est lié à une inhibition de l'activité de la GSK3, observé de façon similaire dans le modèle de souris J20 (Di Lauro et al., 2022, Diaz-Hernandez et al., 2012). De même, Ruan et al., ont montré que l'inhibition de P2X7 dans le modèle de souris P301S avec l'inhibiteur GSK148260 diminuait l'accumulation de protéine Tau et améliorait les déficits mémoriels (Ruan et al., 2020).

Ensemble, ces résultats indiquent que P2X7 représente une cible thérapeutique prometteuse dans la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres tauopathies. Le blocage de P2X7 prévient la détérioration des symptômes cognitifs de la MA en interférant avec la libération de facteurs pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires limitant ainsi la neuro-inflammation cérébrale. Par ailleurs, cibler P2X7 pourrait induire une diminution des lésions spécifiques de la MA : les plaques amyloïdes et l'hyperphosphorylation de Tau.

b. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la substantia nigra du striatum.

Une surexpression de l'ARNm de P2X7 est observée dans la substantia nigra de patients atteints de la maladie de Parkinson (Durrenberger et al., 2012) et dans le striatum d'un modèle de rat de la maladie de Parkinson (Oliveira-Giacomelli et al., 2019) à proximité de microglies activées dans le striatum et la substantia nigra de patients MP (McGeer et al., 1988).

Des expériences in vitro ont montré que l' α -synucléine interagit avec P2X7 sur des cultures primaires de microglie murine. Cette interaction mène à l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT,

l'activation de la NADPH oxidase ainsi que de la microglie résultant en la mort des neurones dopaminergiques (T. Jiang et al., 2015). De plus, es dommages induits par la 6-OHDA sur les cellules SH-SY5Y différenciées en dopamine ont été atténués par l'antagoniste BBG (Carmo et al., 2014).

Dans des modèles animaux de MP, plusieurs études ont montré que le blocage de P2X7 à l'aide d'antagonistes améliorait les symptômes comportementaux de la maladie suggérant que P2X7 est impliqué dans cette pathologie. Dans un modèle de rat de la maladie de Parkinson induit par le 6-OHDA, le blocage de P2X7 suite à l'administration systémique de BBG (45 mg/kg, i.p) améliorait les déficits moteurs et mémoriels de la maladie (Carmo et al., 2014). Des effets similaires ont été observé lorsque le BBG était administré une semaine après l'injection de 6-OHDA (Ferrazoli et al., 2017) et après injection intracérébroventriculaire de BBG (Kumar et al., 2017) ou de l'antagoniste A438079 (Carmo et al., 2014).

De plus, ces effets bénéfiques étaient accompagnés par une diminution de la mort neuronale et reliée à une diminution de la microgliose. En effet, Carmo et al., ont observé une réduction de la perte de dopamine striatale et une atténuation de la microgliose et de l'astrogliose dans le striatum de rats suite à un traitement au BBG (Carmo et al., 2014). A l'appui de ces conclusions, l'activation de la microglie était réduite dans la substantia nigra du modèle de rat de la MP induite par l'injection de 6-OHDA et une restauration des neurones Tyrosine hydroxylase positifs était observée dans le striatum (Oliveira-Giacomelli et al., 2019). De même, dans un modèle de rat de la maladie de Parkinson induite par l'injection intranigrale de LPS, un traitement au BBG (50mg/kg) au préalable de l'injection de LPS diminuait l'activation de la microglie et prévenait la perte des neurones dopaminergiques de la substantia nigra (X.-H Wang et al., 2017). Une augmentation de la libération d'IL-1 β dans la substantia nigra était liée avec l'activation de la microglie et l'apoptose des neurones dopaminergiques (Koprich et al., 2008). Ainsi la libération d'IL-1 β dépendante de P2X7 serait impliquée dans les processus neurodégénératifs.

Dans l'ensemble, ces résultats renforcent l'hypothèse que l'activation du P2X7 microglial est impliqué dans l'aggravation de la MP. L'inhibition de P2X7 pourrait réduire la mort neuronale médiée par la microglie dans le système nerveux durant la MP.

c. Sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie neuro-inflammatoire caractérisée par une réaction auto-immune dirigée contre la gaine de myéline des neurones, la destruction des corps cellulaires des oligodendrocytes et des dommages axonaux. L'Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) est le principal modèle d'étude de cette maladie chez l'animal et est induit, comme l'EAU, par

immunisation avec des peptides de la myéline émulsifié dans du CFA (Constantinescu, Farooqi et al., 2011).

Les analyses post-mortem de la moelle épinière de patients atteints de sclérose en plaques montrent que P2X7 est co-localisé avec la microglie activée et uprégulé sur les astrocytes dans le cerveau (Narcisse et al., 2005 ; Yiangou et al., 2006). Des études additionnelles sur des échantillons de cerveaux de patients SEP ont montré une augmentation de l'expression de P2X7 sur les astrocytes du parenchyme du cortex frontal (Amadio et al., 2017). De plus, une expression accrue de P2X7 est observée dans les voies axonales d'apparence normale des patients atteints de SEP avant la formation des lésions, ce qui implique qu'une dérégulation précoce de la voie P2X7 est impliquée dans le développement de cette maladie (Matute et al., 2017).

L'analyse par immunofluorescence du cortex cérébral de rats EAE, un modèle animal de SEP, a montré une expression précoce accrue par les astrocytes et les microglies activées (Grygorowicz et al., 2016 ; Grygotowicz et Strużyńska, 2019). L'astrogliose et la microgliose ont été réduites après le traitement par BBG, ainsi que la libération de cytokines inflammatoires dans le cerveau. L'inhibition de P2X7 a également retardé l'apparition de l'EAE et amélioré les symptômes neurologiques (Grygorowicz et al., 2016 ; Grygotowicz et Strużyńska, 2019). L'implication de P2X7 dans le développement de la pathologie de la SEP a été mise en évidence par des études in vivo montrant qu'une perfusion de nerfs optiques de rat avec du BzATP peut déclencher des lésions similaires à celles observées dans la SEP. De plus, la démyélinisation induite par l'EAE est réduite après le traitement par BBG (10 mg/kg) et la mort des oligodendrocytes peut être induite par l'ATP et le BzATP in vitro et in vivo (Matute et al., 2017). Ces résultats renforcent le rôle crucial du P2X7 dans le processus inflammatoire et la perte d'oligodendrocytes au cours de la SEP et soutiennent l'utilisation des inhibiteurs du P2X7 comme traitement pour améliorer les symptômes de la SEP.

Cependant, des expériences in vivo sur des souris P2X7 KO ont donné des résultats contradictoires sur la fonction de P2X7 au cours de l'EAE. Dans une étude publiée par Chen et Brosnan, l'EAE était exacerbée chez les souris P2X7KO par rapport aux souris WT. La perte de P2X7 chez ces souris a entraîné une exacerbation de l'inflammation et une propagation excessive de lésions destructrices dans le SNC. De plus, l'analyse du cerveau et de la moelle épinière de souris a montré une diminution du nombre de lymphocytes T apoptotiques dans ces tissus. La perte de l'apoptose des lymphocytes T auto-réactifs dépendante de P2X7 est certainement responsable de l'aggravation de l'EAE (L. Chen & Brosnan, 2006). À l'opposé, Sharp et al., ont remarqué que l'incidence de l'EAE était réduite chez les souris P2X7 KO. Cet effet était lié à une diminution de l'activation des astrocytes et des dommages axonaux (Sharp et al., 2008). Les différences entre ces deux résultats peuvent en partie s'expliquer par les souris transgéniques utilisées dans ces études. Brosnan et al., ont utilisé la souris P2X7 KO de Pfizer (Solle et

al., 2001). Cette souris est déficiente en isoformes P2X7(K), exprimées dans les cellules T, et P2X7(A), présentes dans les cellules dendritiques et les macrophages. En revanche, Sharp et al. ont utilisé la souris P2X7 KO de Glaxo-Smith-Kline (Chessell et al., 2005) qui expriment toujours l'isoforme P2X7(K) dans les cellules T. Ainsi, l'expression de P2X7 dans les lymphocytes T pourrait expliquer les différences observées dans ces deux études.

Dans la SEP, P2X7 jouerait un rôle dans la réponse immunitaire via ses fonctions dans les microglies/macrophages et les cellules T auto-réactives mais aussi directement sur la démyélinisation via son expression par les oligodendrocytes.

d. Dégénérescence maculaire liée à l'âge

La macula est une petite région localisée au centre de la rétine et responsable d'une vision de haute acuité, en raison de sa forte densité de photorécepteurs. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de perte de vision irréversible dans les pays développés, caractérisée par l'accumulation de matériel extracellulaire entre la membrane de Bruch et l'épithélium pigmenté rétinien. Différentes formes de DMLA ont été observées chez les patients. Dans la DMLA sèche, la déficience visuelle est causée par la perte progressive des cellules RPE et des photorécepteurs, conduisant à une atrophie maculaire tandis que dans la DMLA humide, elle est causée par une angiogenèse anormale provoquant un décollement de rétine (Roubeix, Sahel, Guillonnet, Delarasse et Sennlaub 2020).

Il a été montré que les polymorphismes Y315C de P2X4 et G150R de P2X7 étaient surreprésentés chez des patients atteints de DMLA et que la co-expression de ces variants par des monocytes inhibait la phagocytose de particules (Ben J. Gu et al., 2013).

Les souris déficientes en CX3CR1 sont un modèle de DMLA sèche et développent avec l'âge ou sous l'effet de la lumière une accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés conduisant à une dégénérescence des photorécepteurs. Dans ce modèle, les macrophages sous-rétiniens surexpriment P2X7 et libèrent de grandes quantités d'ATP, activant automatiquement leur inflammasome, entraînant une production accrue d'IL-1 β . L'inhibition de P2X7 ou d'IL-1 β a réduit de manière significative l'inflammation et empêché la dégénérescence des photorécepteurs (Hu et al., 2015). Ceci suppose que, dans la DMLA, P2X7 participe à la mort des photorécepteurs en produisant de l'IL-1 β augmentant ainsi l'inflammation rétinienne. Une étude précédente sur le modèle de DMLA sèche induite par l'ARN Alu chez la souris a montré que les souris knock-out pour P2X7 ou traitées avec un inhibiteur de P2X7 étaient protégées contre la dégénérescence de l'EPR grâce à l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 (Kerur et al., 2013). Cibler P2X7 dans la DMLA sèche pourrait affaiblir l'inflammation rétinienne, en

bloquant la voie NLRP3 et la libération d'IL-1 β , empêchant ainsi la perte de photorécepteurs et de cellules RPE. Cependant, Vessey et al., ont observé que des souris P2X7 KO âgées de 18 mois présentaient des similitudes avec les caractéristiques précoces de la DMLA, à savoir l'épaississement de la membrane de Bruch, la perte de cellules RPE et l'inflammation sous-rétinienne (Vessey et al., 2017). On émet l'hypothèse que la fonction scavenger dépendante des macrophages P2X7 est nécessaire pour empêcher l'accumulation de débris cellulaires et préserver l'homéostasie de l'EPR.

En résumé, le blocage P2X7 représenterait une thérapie intéressante en empêchant la propagation de l'inflammation rétinienne et en préservant l'intégrité de la rétine. Cependant, au stade précoce de la DMLA, cela aggraverait la maladie en altérant l'activité de phagocytose des macrophages.

e. Uvéite

Les souris, immunisées avec le peptide IRBP₁₋₂₀, et traitées tous les trois jours, à partir du premier jour après immunisation, avec l'antagoniste de P2X7 oATP ne développaient pas de symptômes cliniques. Cet effet est associé à une diminution du pourcentage de cellules Th17 (IL-17+) dans la rate, sans effet sur le pourcentage de cellules Th1 (IFN-gamma+). Par ailleurs, les cellules T auto réactives de souris traitées à l'oATP présentait des propriétés uvéitogéniques réduites. En plus de moduler la réponse médiée par les cellules T, le traitement à l'oATP contrôlait les fonctions des cellules dendritiques en atténuant leur production d'IL-6 et d'IL-23 (Zhao et al., 2016).

Une autre étude a montré de même que le traitement avec l'antagoniste de P2X7 BBG atténuait la sévérité de l'EAU. De plus, la maladie était moins grave chez les souris déficientes en P2X7 que chez les souris Wild-Type (WT), même si le nombre de cellules Th1, Th17 et Tregs était similaire dans les ganglions lymphatiques drainants des souris EAU (Takeda et al., 2018).

Cependant dans ces deux études, la réponse immunitaire dans la rétine n'a pas été explorée.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les uvéites non-infectieuses sont des maladies inflammatoires intraoculaires caractérisées par une infiltration de lymphocytes T CD4+ auto-réactifs, le recrutement de phagocytes mononuclées depuis la périphérie et l'activation de la microglie rétinienne. La résolution de l'inflammation est médiée principalement par des lymphocytes T régulateurs.

Le rôle du récepteur P2X7 dans l'uvéite a été étudié de façon systémique par inhibition pharmacologique (oATP, BBG) ou par délétion génétique totale (souris $p2x7^{-/-}$) (Zhao et al., 2016 ; Takeda et al., 2018). Dans ces études, la sévérité de la maladie était atténuée après l'inhibition ou la délétion du récepteur P2X7 mais les conséquences sur la réponse immunitaire ont été analysées uniquement à la périphérie, dans les organes lymphoïdes secondaires, et non dans la rétine. De plus, l'invalidation de P2X7 concernait toutes les cellules.

Les objectifs de ma thèse consistaient à étudier le rôle du récepteur P2X7 dans l'EAU selon le type cellulaire l'exprimant tout en portant une attention particulière à l'analyse de la réponse immunitaire dans l'organe cible.

Le premier objectif de ma thèse était d'étudier le rôle de P2X7 sur lymphocytes T effecteurs et régulateurs au cours de l'EAU. Nous avons utilisé le modèle d'EAU passive pour étudier les conséquences de la délétion de P2X7 sur la pathogénicité des lymphocytes T effecteurs. Pour étudier le rôle de P2X7 sur les lymphocytes T régulateurs, nous avons utilisé le modèle de souris FoxP3^{CreERT2}P2X7^{lox} dans lequel P2X7 est délété uniquement dans les lymphocytes T régulateurs après injection de tamoxifène.

Le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier le rôle de P2X7 sur les phagocytes mononuclés et la microglie dans l'EAU. Nous souhaitions savoir si la délétion de P2X7 sur ces cellules modifiait la sévérité de l'EAU ainsi que les modifications transcriptomiques qu'elle entraînait. Nous avons utilisé des souris Cx3cr1^{Cre}P2x7^{lox}, issues du croisement de souris P2x7^{lox} et de souris Cx3cr1^{Cre}, dans lesquelles la Cre recombinase est constitutivement exprimée sous contrôle du promoteur du gène *cx3cr1* et induit la délétion de l'exon 2 du gène codant pour P2X7 dans les phagocytes mononuclés. Afin d'étudier le rôle de P2X7 spécifiquement dans la microglie au cours de l'EAU, nous avons utilisé le modèle de souris transgénique Cx3cr1^{CreERT2}P2x7^{lox}.

Le but de ce travail était de déterminer si P2X7 pouvait représenter une cible thérapeutique dans l'uvéite et au niveau de quelle(s) cellule(s) son inhibition serait effective.

RESULTATS

Macrophage expression of P2X7 controls autoimmune neuroinflammation

Paul-Alexandre Déchelle-Marquet¹, Yueshen Che¹, Frédéric Blond¹, Kaitryn E Ronning¹, Sébastien Augustin¹, Pauline Lagouge-Roussey¹, Caroline Nous¹, Sara Touhami^{1,2}, Bahram Bodaghi², Jean Kanellopoulos³, Sahil Adriouch⁴, Xavier Guillonneau¹, Florian Sennlaub¹, Cécile Delarasse¹

¹Sorbonne University, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France

²Department of Ophthalmology, Sorbonne University, Pitié Salpêtrière University Hospital, Paris, France.

³Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, France

⁴University Rouen Normandie, INSERM, U1234, Pathophysiology Autoimmunity and Immunotherapy (PANTHER), Normandie Univ, 76000, Rouen, France.

Running title: P2X7 and autoimmunity

Abstract

The release of danger-associated molecular patterns (DAMPs) from damaged cells is a crucial factor driving sterile inflammation. Among these DAMPs, extracellular ATP activates the immune receptor P2X7. P2X7 is expressed by mononuclear phagocytes (MPs) and T cells, both of which play a pivotal role in the pathogenesis of autoimmune diseases. However, the precise contribution of P2X7 expressed by these cells in these processes remain unclear. Here we used a mouse model of autoimmune neuroinflammation, the experimental autoimmune uveitis (EAU), to delineate the role of P2X7 based on its expression in specific immune cell subsets. Through adoptive transfer experiments and the use of cell-specific knockout mice, we showed a pivotal role for P2X7 expressed by MPs in orchestrating T-cell-mediated autoimmune responses. P2X7 deficiency in MPs led to the development of a less severe disease, which was associated with reduced expression of genes related to the complement, inflammasome and phagocytosis pathways, along with a marked decrease in Th17 cell frequency in the retina. Additionally, cell-specific transcriptomic analyses indicated that P2X7 exerted distinct modulatory effects on MP subpopulations, and P2X7-deficiency particularly impacted an IFN-responsive microglia subset. These findings suggest that inhibition of P2X7 could be a promising therapeutic strategy in autoimmune neuroinflammatory disorders.

Key words: Autoimmunity, Macrophage, Microglia, Purinergic receptor, Neuroinflammation, Uveitis

Highlights

- P2X7 expressed on MPs and not CD4⁺ T-cells is mainly involved in the development of EAU
- P2X7 is involved in multiple signalling pathways during EAU: complement, phagocytosis and inflammasome pathways.
- MPs expressing P2X7 regulate IL17A–expressing CD4⁺ T cells
- P2X7 plays different functions on microglia and MdM subsets during EAU
- P2X7 expressed by microglia contributes to the development of EAU

Introduction

Danger-associated molecular patterns (DAMPs) are produced or released by damaged and dying cells to activate the innate immune system. This sterile inflammation promotes tissue repair and regeneration but can also contribute to the development of inflammatory diseases including cancer, autoimmune diseases and neurodegenerative diseases (1). Endogenous DAMPs include intracellular nucleic acids and proteins, such as DNA, high mobility group box 1 (HMGB1), interleukin-33 (IL-33), or adenosine triphosphate (ATP). Among the immune receptors that recognize these signals, the P2X7 receptor is activated by high concentration of ATP released from the intracellular content of cells, where ATP level is elevated (mM range) in contrast to the extracellular space (nM range).

P2X7 is a potent activator of the NLRP3 inflammasome, leading to the cleavage of pro-IL-1 β and pro-IL-18 and the release of the mature forms by mononuclear phagocytes (MPs) (2, 3). Moreover, P2X7 mediates cleavage of cell surface proteins such as TNF α by ADAM17 (4, 5) and the production of reactive oxygen species (ROS) and IL-6 (6-10). P2X7 is also an important regulator of T cell functions and was shown to be involved in T-cell activation, proliferation and cell death depending on T-cell subsets, P2X7 expression level and the amount of ATP (10-12). Several data also provide strong evidence for the participation of P2X7 in Th1/Th17 polarization, but the direct or indirect role of P2X7 via neighboring cells is still undetermined (2). In addition, our previous studies have shown that P2X7 is also involved in the production of the chemokines by glial cells suggesting an indirect role of P2X7 in T-cell recruitment (13, 14). Hence, the role of P2X7 has been studied extensively in the context of infection and inflammation. The evidence suggests that P2X7 enhances the immune system's response against pathogen infections, triggers microbicidal mechanisms and helps controlling infection. Conversely, in inflammatory and neurodegenerative diseases P2X7 contributes to pathological processes (2, 10, 15). Nevertheless, the function of P2X7 in the context of autoimmune diseases involving innate and adaptive immune cells remains poorly understood.

Systemic or organ-specific autoimmune diseases are caused by dysregulation of the immune system leading to the activation of autoreactive lymphocytes. The mechanisms by which autoreactive T cells trigger pathology have been characterized in various autoimmune models. The disease is first initiated by activation of CD4⁺ T-cells in secondary lymphoid organs and their differentiation into T helper 1 (Th1) and Th17 cells. In the second phase, these autoreactive T-cells infiltrate the target organ and mediate the recruitment and activation of

MPs leading to tissue damage (16). Finally, the disease progression is modulated by the suppressive functions of regulatory T-cells (Tregs). However, the identification of therapeutic targets to control this T-cell mediated inflammation are still the subject of intense research.

Among autoimmune diseases, non-infectious uveitis (NIU) is a group of inflammatory intraocular diseases which can be debilitating and lead to blindness (17). NIU can be related to systemic auto-inflammatory disorders (Sarcoidosis, Behçet's disease, Vogt-Koyanagi-Harada disease) or eye-limited (18). Some patients are refractory to the usual corticosteroid-based treatments or have severe side-effects with long-term treatment stressing the need for new therapeutic targets.

In the present study, we explored the cell-specific role of P2X7 in the pathogenesis of autoimmune neuroinflammation using experimental autoimmune retinal uveitis (EAU), a model of autoimmune uveitis (16). Using cell specific knock-out mice, we showed that disruption of P2X7 in MPs or only in microglia specifically led to a notable reduction of the clinical severity of the disease and infiltration of leucocytes, while lack of P2X7 expression in T-cells or in Tregs specifically did not alter the development of the disease. Furthermore, we found that P2X7 deletion in MPs reduced the expression of genes related to pro-inflammatory mediators and the phagocytosis pathway but also indirectly controlled Th17 response. In summary, our study revealed a major role of P2X7 expressed by MPs during autoimmune neuroinflammation.

Material and Methods

Animals

Both female and male mice aged 8 to 12 weeks were used for this project. Wild-type C57BL/6 mice were purchased from Janvier Laboratories. P2X7 knock-out (P2x7^{-/-}) mice generated by Gabel's group at Pfizer were obtained from the Jackson Laboratory (strain # 005576) (19). P2X7^{lox/lox} (P2X7^{lox}) mice were engineered as previously described (20). P2X7^{lox} mice were crossed with Foxp3^{creER} mice (strain # 016961) (21), Cx3cr1^{cre} mice (strain #025524), or Cx3cr1^{creER} mice (strain #020940)(22), all obtained from the Jackson Laboratory, to generate cell-specific conditional P2X7 knockout and P2X7^{lox} control mice. All cre mouse strains were heterozygous. All mice were negative for the Crb1^{rd8} mutation, to avoid confusion of retinal phenotypes due to this mutation. The animals were housed in cages in groups of 5 with enrichment on ventilated racks (temperature and hygrometry automatically regulated) with a 12h/12h lighting cycle. After the arrival of the mice, a week of acclimatization was respected before experimentation. All experimental protocols and procedures were approved by the French Ministry of higher Education, Research and Innovation (APAFIS #32691-2021080310403747 v5) and followed the European directive 2010/63/UE, in agreement with the ARRIVE guidelines.

Treatment with Tamoxifen

Tamoxifen (Sigma) was dissolved in corn oil (Sigma) at a concentration of 20 mg/ml. Mice received daily intraperitoneal injection of tamoxifen (100mg/kg) for 5 consecutive days.

Induction of EAU

For active induction of EAU, mice were immunized subcutaneously with 200 µg of IRBP₆₅₁₋₆₇₀ (LAQGAYRTAVDLES LAQT) (GeneCust) emulsified in Complete Freund's Adjuvant (CFA) containing 3.3 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Sigma-Aldrich & BD Difco). Mice also received an intraperitoneal injection of 1 µg of purified *Bordetella pertussis* toxin (Sigma-Aldrich)(23).

For adoptive transfer, donor mice were immunized as described above. 10 days after immunization, spleens and lymph nodes were collected and mechanically dissociated. Cell suspensions were cultured for 72 hours in RPMI 1640 supplemented with fetal bovine serum 10%, gentamycin (50 µg/mL) and 2-mercaptoethanol (50 µM) in the presence of IRBP₆₅₁₋₆₇₀ (25 µg/mL) and IL-12 (5 ng/mL) (Peprotech) for Th1 polarization or IL-6 (20 ng/ml), IL-23 (10 ng/mL), IL-1β (10 ng/mL) and TGF-β (2 ng/mL) (Miltenyi) for Th17 polarization. After 3 days,

lymphocytes were purified by gradient centrifugation on Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare) and counted. 2×10^7 cells were injected intravenously into recipient mice.

Clinical signs of EAU were assessed daily by fundus examination on a scale of 0–5 based on the extent of inflammation, as described (24).

Flow cytometry

Lymph nodes were mechanically dissociated into a Petri dish and filtered through a 70 μ m cell strainer to obtain a single cell suspension. Individual eyes were collected on ice and dissected by first sectioning the limbus and removing the cornea and lens. Individual retinas were incubated at 37°C for 30 minutes in PBS containing the enzyme Liberase TL at 1.6 Wunsch unit/mL (Sigma-Aldrich). Individual retinas were then filtered and rinsed through a 70 μ m cell strainer to obtain a single cell suspension. Dead cells were stained with Viability™ Fixable Dye (Miltenyi Biotec). Cytometry was performed using the following antibody clones specific for: CD45 (REA737), CD11b (REA592), Ly6C (REA796), Ly6G (REA526), MHCII (REA813), CD11c (REA754), CD3 (REA641), CD4 (REA604), CD44 (REA64), CD62L (REA828), CD80 (REA983), CD86 (REA1190) (Miltenyi Biotec) and P2X7 (1F11) (Biolegend). For surface labeling, cells were incubated with the respective antibodies for 30 min at 4 °C and then fixed in paraformaldehyde 1% (PFA). For the FOXP3 detection, FOXP3 staining kit and anti-Foxp3 antibody (REA788) (Miltenyi Biotec) were used according to the manufacturer's instructions.

For intracellular labeling of IFN- γ and IL-17A, cells were incubated for 4 h at 37 °C in RPMI with the cell stimulation and protein transport inhibitor cocktails (ebioscience™). After surface staining, cells were fixed and permeabilized with fixation/permeabilization buffer (Invitrogen) and stained with antibodies against IFN- γ (REA638) and IL-17A (REA660). Acquisition was performed on a Celesta SORP cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed with FlowJo 10.8.

Fluorescence activated cell-sorting

Preparation of cell suspensions from individual mouse retinas and lymph nodes was performed as described for flow cytometry. Retinal and lymph nodes cells were labelled with the following antibodies: anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD11c and anti-Ly6G (Miltenyi). Dead cells were excluded from the analysis using a Live/Dead fixable staining reagent (Miltenyi). CD45⁺CD11b⁺Ly6G^{neg} retinal cells and CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺ lymph node cells were sorted, collected in a chilled tube, and then used for RNA and scRNA-sequencing (below).

Bulk and single-cell RNA sequencing

For bulk RNA sequencing: RNAseq libraries were prepared from 3 ng of total RNA using the SmartSeq V4 Library Preparation Kit (Takara) and sequenced on an Illumina Novaseq 6000 sequencer.

Fastq files obtained from the sequencing were aligned using STAR (v2.7.9a) against the mouse reference genome from Ensemble Mouse v106 (2022/06/21), with option “--quantMode GeneCounts” to extract the raw counts for each gene, and all count files were concatenated into a single file. A sample file was created with the sample data including the conditions (P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}) and the replicate numbers. The count file and the sample file were loaded in our in-house R Shiny application EYE DV seq. We added 1 to all counts in the count file to avoid any 0 read count errors. We then removed the genes having a total count < 10 across all samples. Finally, the DESeq2 (v1.40.2) analysis was performed comparing the groups defined in the ‘condition’ column, with ‘P2x7^{lox}’ as control group and ‘Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}’ as condition. The results were then filtered for significant genes using the padj-values < 0.05, BaseMean > 10, and Log2FC > 0.75. An enrichment analysis was performed to study the implicated pathways, using the Reactome database (using the Bioconductor package ‘ReactomePA’ (v1.44.0) and the GO database (using the Bioconductor packages org. Mm.eg.db (3.10.0) and ‘clusterProfiler’ (v 4.8.1)).

We performed the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using the Broad Institute application (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>). We used the reference Mouse_Ensembl_Gene_ID_MSigDB.v2023.2.Mm.chip as chip platform, and the gene sets database m5.go.bp.v2023.2.Mm.symbols.gmt to which we added our custom gene sets for the inflammasome and phagocytosis pathways. We then ran the application with the default parameters. To test our gene sets' significance, we used ROAST (25) from the Bioconductor package limma (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>). We investigated our gene sets for inflammasome and chemokine pathways with 10000 rotations as per their guidelines.

For single-cell RNA sequencing (scRNAseq): The barcoded cDNAs were prepared from sorted cells using a 10x genomics chromium and were used to construct the indexed scRNA sequencing libraries according to Chromium Next GEM Single Cell 3' Library v3.1 and dual Index Kit TT according to manufacturer's protocol. Libraries were sequenced on an Illumina

Novaseq 6000 sequencer. The Fastq files were processed using Cellranger v6.1.2 with default options (alignment, count). The resulting expression matrices were merged and analyzed with Seurat v4 (merge, QC filtering, normalization, PCA, clustering, UMAP/tSNE). The resulting Seurat object was used to create a H5AD file that was used as input for cellxgene for visualization and data exploration. Further analyses were performed in cellxgene using the cellxgene_VIP plugin (differential analysis, various visualizations, etc.). Processing scripts are available on demand. Genes interaction analysis was performed using STRING consortium (26).

Statistical Analysis

Sample sizes for our experiments were determined according to our previous studies. Graph Pad Prism 10 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between two groups were analyzed using an unpaired Mann-Whitney test. Significance levels are marked *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. The n and p-values are indicated in the figure legends.

Results

P2X7 deficiency decreases the severity of EAU

Studies of the role of P2X7 in experimental autoimmune encephalitis (EAE) have produced contradictory results (27-29) and earlier studies on EAU suggested that inhibition of P2X7 might reduce the severity of disease (30, 31).

To evaluate whether P2X7 influenced EAU induced with the retinal autoantigen IRBP-peptide 651 to 670 (IRBP₆₅₁₋₆₇₀), the most reproducible EAU model, we first immunized P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice with the retinal antigen in complete Freund's adjuvant (CFA) (Fig. 1A). Clinical evaluation 12 days after the immunization revealed a significant reduced disease in P2x7^{-/-} mice (clinical score = 1.6±0.28) compared to P2x7^{+/+} mice (clinical score = 3.2±0.26). We used flow cytometry to analyze the immune cell infiltration in the retina during EAU. Our analysis of EAU retina at day 13 revealed a reduction of microglial cells (CD11b⁺CD45^{med}), monocyte-derived mononuclear phagocytes (MdMs) (CD11b⁺CD45^{high}), CD4⁺ T-cells (CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg}), and Tregs (CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺) in P2x7^{-/-} mice (Fig. 1B). This reduction was significant for MdMs and CD4⁺ T-cells. However, the frequency of immune cells in the draining lymph nodes were not affected by the lack of P2X7 expression (Fig. 1C). To identify the immune cells that potentially play a role in pathological processes through P2X7 expression, we analyzed P2X7 expression by immune cells 13 days after EAU induction. Flow cytometry analysis of the retina of naïve mice showed that all resident microglial cells expressed P2X7 (Fig. 1D). During EAU, microglial cells maintain their P2X7 expression without downregulation (95.1%±1.73) (Fig. 1E). Half of MdMs (51.2%±1.77) that infiltrate the retina exhibit P2X7 expression, and only a subset of CD4⁺ T cells (52.0%±2.54) demonstrate P2X7 expression, a pattern similarly observed in Tregs (41.3%±1.54) (Fig. 1E).

These findings confirm that P2X7 plays a significant role in the overall development of EAU. We show that both innate and adaptive immune cells express P2X7, prompting the question of how P2X7 influences the various functions of different immune cells during EAU.

P2X7-deficiency does not affect the activation of dendritic cells and CD4⁺ T cells

The decreased disease severity observed in P2X7-deficient mice could be attributed to a reduced number of autoreactive T-cells resulting from impaired T cell activation. Several studies suggest a role of P2X7 during antigen presentation and T-cell activation (32). Next, we

investigated whether the absence of P2X7 might affect T-cell activation by antigen-presenting cells. We analyzed dendritic cells and T cell activation in lymph nodes of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice by flow cytometry, 10 days after immunization with the IRBP peptide.

We first analyzed P2X7 expression in dendritic cells (MHCII⁺CD11c⁺) and noticed two subpopulations: one expressing P2X7 (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺) and the other not expressing it (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁻) (Fig. 2A). To activate T-cells, dendritic cells present the antigen on the surface of MHC and provide a co-stimulation signal *via* the expression of CD80 and CD86. The CD11c⁺CD11b⁺ population expressing P2X7 expressed the co-stimulatory molecules CD80 and CD86, but the absence of P2X7 did not affect their expression levels (Fig. 2 B,C). We also analyzed the transcriptome of FACS sorted CD11c⁺CD11b⁺ cells from the lymph nodes of immunized P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice using RNA sequencing and did not observe any major differences (Suppl Fig. 1). These findings suggested that lack of P2X7 did not affect the activation state of DCs in the lymph nodes.

On the other hand, we observed that only a proportion of CD4⁺Foxp3^{neg} T cells (17.9%±0.86) expressed P2X7, while the majority of Tregs (CD4⁺Foxp3⁺) (82.2%±3.60) expressed P2X7 (Fig. 2D). Furthermore, we did not observe any significant effect in the frequencies of CD4⁺ T cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells associated with the lack of P2X7 expression (Fig. 2 E,F). CD4⁺ T cell activation states were evaluated by the cell surface expression of the adhesion proteins CD44 and CD62l and the enzyme CD45RB: naïve T cells (CD44⁻CD62l⁺ or CD44⁻CD45RB⁺), central memory T cells (CD44⁺CD62l⁺ or CD44⁺CD45RB⁺) and effector T cells (CD44⁺CD62l⁻ or CD44⁺CD45RB⁻). We also analyzed the cell surface marker CD45RB because it has been shown that P2X7 activation could lead to cleavage of CD62l (33). The proportion of each population of CD4⁺ T cells were not significantly different between P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice (Fig. 2 G,H).

Altogether, these results suggested that lack of P2X7 did not impair DC and CD4⁺ T cell activation during EAU development.

Lack of P2X7 expression in CD4⁺ T cells does not alter their functions during EAU

Based on our observation, P2X7 deficiency did not prevent the generation of autoreactive T cells. However, absence of P2X7 in T cells could impact their ability to cross the blood retinal barrier via the shedding of CD62l and also affect their pathogenicity via the release of cytokines *in situ*. Furthermore, effector CD4⁺ T cells but also the majority of Tregs expressed P2X7 in the

lymph nodes (Fig. 2D). Tregs were shown to be highly sensitive to cell death induced by P2X7 activation (34, 35). Thus, we asked whether P2X7 deletion in Tregs could influence their ability to regulate effector T cells *in vivo* during EAU.

To answer this question, we first compared EAU induced by adoptive transfer of activated T cells isolated from P2x7^{+/+} or P2x7^{-/-} donor mice to wild-type (WT) recipient mice (Fig. 3A). All mice developed EAU with similar clinical score 4 days after adoptive transfer of P2x7^{+/+} (clinical score = 3.9±0.10) or P2x7^{-/-} (clinical score = 3.9±0.07) T cells (Fig. 3B). We also analyzed P2X7 expression by CD4⁺Foxp3^{neg} and CD4⁺Foxp3⁺ T cells in the retina after adoptive transfer. Interestingly, in the retinas of WT mice that received P2x7^{-/-} T cells we observed similar number of CD4⁺Foxp3⁺ T cells expressing P2X7 as in mice receiving P2X7^{+/+} T cells, suggesting that infiltrating Tregs predominantly originated from the recipient WT mice in this model (Fig. 3C). Then, we analyzed immune cell infiltration in the retina and the frequency of T cells in cervical draining lymph nodes by flow cytometry 6 days after adoptive transfer. We showed that the number of microglia, infiltrating MDM, and CD4⁺Foxp3^{neg} and CD4⁺Foxp3⁺ T cells were similar in the retina of mice receiving P2x7^{+/+} or P2x7^{-/-} T cells as well as the frequency of Tregs among CD4⁺ T cells (Fig. 3D). In addition, no significant difference was observed in the lymph nodes (Fig. 3E). These results suggested that the absence of P2X7 expression by T cells did not affect their ability to induce EAU.

In EAU experiments induced by adoptive transfer of T cells we noted that the vast majority of effector T cells appeared to come from the donor mice, whereas regulatory T cells seemed to originate from the recipient mice. Therefore, we conducted experiments transferring T cells from CD45.1 mice into CD45.2 mice and demonstrated that ~77% of CD4⁺Foxp3^{neg} T cells express the donor marker CD45.1, compared to only ~13% for CD4⁺Foxp3⁺ T cells (Suppl Fig.2). These results are consistent with our findings showing P2X7 expression in Tregs after transfer of activated P2X7-deficient T cells (Fig. 3C).

Then, to investigate the specific role of P2X7 expressed by Tregs independently of its expression by effector T cells, we generated mice deficient for P2X7 in Tregs (Foxp3^{creER}xP2X7^{lox} mice). One week after tamoxifen treatment, we induced active EAU in P2X7^{lox} and Foxp3^{creER}xP2X7^{lox} mice (Fig. 3F). We evaluated the clinical score by fundoscopic examination and showed that the severity of the disease was not significantly different between P2x7^{lox} (clinical score = 0.9±0.20) and Foxp3^{creER}P2x7^{lox} (clinical score = 1±0.25) mice 12 days after EAU

induction (Fig. 3G). Flow cytometry analysis of T-cells from the retina of $Foxp3^{creER}\times P2X7^{lox}$ mice during EAU showed expression of P2X7 by $CD4^+Foxp3^{neg}$ T cells but not $CD4^+Foxp3^+$ T cells confirming the specific deletion of P2X7 in Tregs (Fig. 3H). Flow cytometry analysis of retinal inflammation showed that P2X7 deletion in Tregs did not affect the infiltration of macrophages and $CD4^+Foxp3^+$ T cells in the retina, 12 days after EAU induction (Fig. 3 I,J). Interestingly, neither the frequency of $CD4^+Foxp3^{neg}$ T cells nor the proportion of Tregs among $CD4^+$ T cells were affected by P2X7 deletion in the retina and in the cervical lymph nodes (Fig. 3I,J). These results suggested that the specific deletion of P2X7 in Tregs did not impair the auto-immune response.

Taken together, our data suggested that expression of P2X7 in T cells did not play a detectable role in the development of EAU.

P2X7-deficiency in resident microglial cells and infiltrating MDMs reduces the severity of EAU

Next, we investigated the role of P2X7 expressed in innate immune cells during EAU. The disease was induced in $Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}$ mice in which the *P2rx7* gene is specifically deleted in MDMs and microglia compared to $P2x7^{lox}$ control mice (Fig. 4A). Clinical assessment of these animals by fundoscopic examination showed that the severity of EAU was significantly attenuated in $Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}$ mice (clinical score = 1.3 ± 0.3) vs $P2x7^{lox}$ mice (clinical score = 2.2 ± 0.3) (Fig. 4B). P2X7 deletion in microglia and MDMs in the retina of $Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}$ mice was confirmed by flow cytometry (Fig. 4C). Flow cytometry analysis of immune cells in the retina showed that lack of P2X7 in microglia and MDMs resulted in a significant increase in microglia, MDMs, $CD4^+$ T-cells and Tregs, with no effect on the frequency of Tregs among $CD4^+$ T cells (Fig. 4D). No significant variation in the frequencies of immune cells between both groups was noticed in the cervical lymph nodes (Fig. 4E).

To identify the molecular pathways affected by the P2X7-deficiency, we cell-sorted $CD45^+CD11b^+$ cells by fluorescence-activated cell sorting from the retinas of $Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}$ and $P2x7^{lox}$ mice 13 days after EAU induction and analyzed their transcriptomes by RNAsequencing (RNAseq). We found that 1287 genes were significantly down-regulated and 1086 genes were up-regulated in $Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}$ compared to $P2x7^{lox}$ ($\text{Log}_2\text{FC} > 0.75$ and $\text{padj} < 0.05$; Suppl Table 1). We primarily focused our analysis on down-regulated genes because we hypothesized that the absence of P2X7 improved the pathology by reducing the inflammatory response (Fig. 5A). Interestingly, among the genes that were the most regulated

we found *Adam10* and *Adam17*, two genes involved in the release of $\text{TNF}\alpha$, as well as genes that belong to the complement pathway (*C3*, *C4b*, *Cfh*) and a large number of genes belonging to the phagocytosis pathway (48/233 genes belong to the phagocytosis pathway Goterm GO0006909) (Fig. 5A, B). Indeed, when we carried out gene set enrichment analysis (GSEA) we found a significant enrichment in phagocytosis-associated genes (normalized enrichment score (NES) = 1.47, $p = 0.0$, false discovery rate (FDRq) = 0.09) (Fig. 5B). In addition, we examined whether the absence of P2X7 could lead to modification of the expression of other purinergic receptors (P2X and P1 receptors) or ATP-degrading enzymes (CD39 and CD73 ectonucleotidases). We observed that the levels of the expression of these genes were not significantly different between cells from *Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}* and *P2x7^{lox}* mice (Fig. 5C). While individual genes may not exhibit statistically significant modulation, the collective group of genes to which they belong can undergo significant modulation. Thus, we also conducted a complementary analysis of the candidate pathways. We selected genes of the inflammasome and chemokine pathways that were previously associated with P2X7 activation. We found that the inflammasome pathway was significantly down-regulated in CD11b^+ cells from *Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}* (FDR = 0.001) mice but not genes of the chemokine family (Fig. 5D). We also noticed a significant GSEA enrichment in transcripts related to the inflammasome (NES= 1.55; $p = 0.04$, FDRq = 0.07).

Altogether, these results suggested that the lack of P2X7 expression by MPs decreased the severity of the EAU and could be attributed to the down regulation of complement, inflammasome and phagocytosis pathways.

P2X7 deficiency in resident microglial cells and infiltrating MdMs reduces Th17 cell differentiation *in vivo*

We demonstrated that the absence of P2X7 in microglia and infiltrating MdMs reduced inflammatory processes within these cells. Th17 cells play a major effector function in EAU pathogenesis and the IL17 response is associated with disease severity (36). Previous studies have indicated that total knockout of P2X7 can alter the differentiation of CD4^+ T cells into Th1 and Th17 subsets (2, 11), and our observations revealed that the lack of P2X7 downregulated the inflammasome pathway, which has been implicated in Th17 polarization (37). So, we questioned whether the absence of P2X7 in microglia and MdMs could influence the pathogenic T-cell response.

Activated T cells were adoptively transferred in P2x7^{+/+} or P2x7^{-/-} recipient mice and the frequencies of CD4⁺ T cells producing IFN γ and/or IL17A in the retina were analyzed 6 days after adoptive transfer (Fig. 6A). We observed no significant differences in the proportion of IFN γ -producing CD4⁺ T-cells while the proportion of IL17-producing CD4⁺ T-cells and double positive (DP) cells were significantly decreased in P2x7^{-/-} (decrease 35.7% and 43.3% respectively) (Fig. 6A). When we induced Th17 polarization in the adoptively transferred T cells by treating them with IL-6, IL-23, IL-1 β and TGF- β cytokines before transfer, we increased the number of the IL17A-producing CD4⁺ T-cells. However, even after this increase, we still observed a decrease of the proportion of IL17A⁺ and DP CD4⁺ T-cells in the retinas of P2x7^{-/-} recipient mice (decrease 43.7% and 43.2% respectively) (Fig. 6B). To demonstrate the involvement of P2X7 expressed by microglia and MdMs in the observed shift in T-cell polarization, we adoptively transferred Th17 polarized T-cells in Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} and P2x7^{lox} mice. We showed a reduced frequency of IL17A⁺ and DP CD4⁺ T-cells in Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice compared to P2x7^{lox} mice (decrease 49.1% and 41.2% respectively) (Fig. 6C).

Together, these results suggested that P2X7 expression in MPs play a role *in vivo* in T-cell polarization toward the Th17 phenotype during EAU.

Lack of P2X7 affects microglia and infiltrating MdM subpopulations differently during EAU

We highlighted the different pathways affected by the absence of P2X7 expression in MdMs and microglia. To go further in our analysis, we investigated whether P2X7-deficiency had a different impact on the different MP subpopulations.

We performed scRNAseq on 27,712 sorted CD45⁺CD11b⁺LyG⁻ cells from the retina of naïve WT mice (Fig. 7A left) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} and P2x7^{lox} mice that developed EAU (Fig. 7A right and Suppl Fig. 3). Unsupervised clustering revealed 9 major CD11b⁺ subpopulations in the retina based on the expression of 23 known cell-type-specific markers (Fig. 7A, B)(38, 39) and we observed that P2X7 was mainly expressed in microglia, MdM#1, and MdM#2 subpopulations (Fig. 7C). We identified the differentially expressed genes (DEGs) in these clusters between Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} and P2x7^{lox} mice and found 22 genes significantly down-regulated and 6 genes up-regulated in EAU microglia, 62 down-regulated genes and 15 up-regulated genes in MdM#1 and 61 down-regulated genes and 10 up-regulated genes in MdM#2 (Log2FC > 0.25 and padj < 0.05; Suppl Table 2). Interestingly, examination of downregulated DEGs revealed their association with different pathways in the three

subpopulations (Fig 7 E, F). *Cx3cr1*, *Cxcr4*, and genes associated with the IFN pathway were modulated in activated microglia, whereas genes belonging to complement and phagocytosis pathways were exclusively impacted in MdM#1 and MdM#2 subpopulations. These data showed that lack of P2X7 modified the expression of different genes and pathways in activated microglia and infiltrating MdMs.

We further analyzed the microglial population in EAU and investigated the expression of genes linked with a homeostatic phenotype (*C1qa*, *Csf1r*, *Hexb*, *Tmem119*, *P2ry12*, *Tgfbr1*, *Mef2a*, *Olfml3*), neurodegeneration-associated signature genes (*ApoE*, *Trem2*, *Cst7*, *Itgax*, *Spp1*, *Lpl*, *Fgf1*)(40, 41), and IFN-response genes (*Ifitm3*, *Isg15*, *Irf7*, *Stat1*)(42, 43)(Fig. 7G). We observed that EAU microglia expressed the core microglial markers *C1qa*, *Csf1r*, and *Hexb*. Consistent with previous findings in the EAU model, we found that TGFβ-dependent homeostatic genes (*Tmem119*, *P2ry12*, *Tgfbr1*, *Mef2a*, *Olfml3*) were down regulated (41). Genes associated with mouse model of neurodegenerative diseases were barely expressed, such as *Cst7*, *Itgax*, *Spp1*, *Lpl*, and *Fgf1* or were notably down-regulated, such as *Trem2*, a well-known marker for disease associated microglia (DAM)(44). Interestingly, we showed heightened expression of the inflammatory associated gene *ApoE* and upregulation of the IFN-responsive markers *Ifitm3*, *Isg15*, *Irf7*, and *Stat1* (42). “IFN-response microglia” were initially identified in the central nervous system of mice in response to virus, LPS, and glioma (42) but also found after spinal cord injury (43). We asked whether lack of P2X7 in MP could affect this specific subpopulation. We assessed the frequency of “IFN-response microglia” defined by *Ifit3*, *Oas3*, *Ifitm3*, *Isg15*, *Irf7*, and *Stat1* expression (42, 43) and found that this sub-population was decreased by ~37% among microglia from the retinas of *Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}* mice (292/2052 microglia - 14.2%) compared to *P2x7^{lox}* mice (288/1267 microglia - 22.7%) during EAU (Fig. 7H). These results indicate that the absence of P2X7 differentially impacted the MP subpopulations, leading to a decrease in complement and phagocytosis pathways in MdMs and a reduction in the IFN-responsive microglia population.

P2X7 in microglia is involved in the pathogenic processes during EAU

Microglia have been reported to be essential for the development of EAU (45, 46). However, in models of retinal degeneration MdMs are the major driver of pathological processes while some microglial subpopulations appear to be protective (47). This led us to question whether

microglial cells expressing P2X7 might form a particular subpopulation with potentially detrimental properties.

We used Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice to delete P2X7 expression specifically in microglial cells. Four weeks after tamoxifen treatment, we induced active EAU in P2X7^{lox} and Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice (Fig. 8A). Clinical assessment of these animals by fundoscopic examination showed that EAU severity was significantly reduced in Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice (clinical score = 1.2±0.3) compared to P2x7^{lox} mice (clinical score = 1.9±0.2) (Fig. 8B). We confirmed by flow cytometry that P2X7 was not present in microglia but still expressed in infiltrating MdMs in Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice during EAU (Fig. 8C). Analysis of microglia, infiltrating MdMs, and T-cells showed that the proportion of immune cells was significantly reduced in the retina of Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice vs P2x7^{lox} mice during EAU (Fig. 8D). We did not observe any significant difference in the proportion of immune cells in the cervical lymph nodes between both groups of mice (Fig. 8E).

Overall, these data suggested that P2X7 expressed specifically by microglia contributes to the development of EAU.

Discussion

In this study, we analyzed the role of P2X7-expressing immune cell types in the development of EAU. We showed a pivotal role of P2X7-expressing MPs in the control of autoimmune neuroinflammation. We demonstrated that the absence of P2X7 in these cells leads to a down-regulation of the expression of pro-inflammatory molecules, including the NLRP3 inflammasome and complement elements. While the suppression of P2X7 on T cells had no detectable effect on the disease, MP P2X7 indirectly shaped the phenotype of Th17 cells. In addition, the lack of P2X7 in MPs significantly altered the subpopulation of IFN-responsive microglia that had a detrimental impact on the progression of EAU. Together, our data support a model in which P2X7 activation on MPs controls the phenotype of autoreactive T-cells, in addition to promoting pro-inflammatory processes within the P2X7-expressing MPs.

In agreement with previous studies (30, 48), we showed that ubiquitous lack of P2X7 during EAU protected against the clinical development of EAU and also decreased neuroinflammation in the retina. Interestingly, although the persistence of the P2X7 expression in T cells in one of the P2X7 knockout mouse lines has been proposed as a potential explanation for the divergent outcomes observed in these mice during EAE (11, 15), we here showed that lack of P2X7 expression in CD4⁺ T cells did not significantly impact their activation and pathogenicity in EAU. Tregs are particularly susceptible to P2X7-dependant apoptosis (34), suggesting that lack of P2X7 expression in these cells could alter the CD4⁺ T cell to Treg cell ratios. To test this hypothesis, we specifically ablated P2X7 in Tregs and we observed that P2X7 expression in these cells did not impact the frequency of effector T cells and Tregs in the retina. This is possibly due to the fact that although approximately 80% of Tregs expressed P2X7 in the draining lymph nodes, the level of ATP might not be sufficiently high to affect P2X7-dependent CD4⁺ T cell properties. In the diseased retina on the other hand, ATP levels are likely high enough to activate P2X7, but the downregulation of P2X7 expression in Tregs (only about 40% of retinal Tregs expressed P2X7) could make them less susceptible to P2X7-mediated apoptosis.

Importantly, our work highlights a major role of P2X7-expressing MPs in the development of EAU. We showed that lack of P2X7 in MPs decreased the severity of the clinical signs of EAU and diminished immune cell infiltration in the retina. Transcriptomic analysis of MPs in the EAU retina revealed that the lack of P2X7 in this cell type down-regulated genes belonging to the

phagocytosis and inflammatory pathways. Several of these pro-inflammatory mediators are known to be involved in the inflammatory response in autoimmune models, in particular the P2X7-dependent inflammasome pathway which leads to the release of IL-1 β and IL-18 (2). Of note, the metalloproteases ADAM10 and ADAM17 were also down-regulated in P2x7^{-/-} MPs, which likely reflects the well-known role of P2X7 in the shedding of cell surface proteins like CD62I (33), APP (49), interleukin-6 receptor (50), and TNF α (5, 9, 51). Thus, the reduced expression of these proteases likely results in lower TNF α levels. Additionally, the lack of P2X7 in MPs reduced the expression of components of the complement-system, in particular the C4b isoform and C3, which is cleaved into C3b and the anaphylatoxin C3a in the complement cascade. Therefore, P2X7-dependent production of inflammatory mediators contributed to the pro-inflammatory environment leading to tissue damage in EAU.

Furthermore, our scRNAseq analysis showed that C3aR1 and C5aR1, the two receptors for anaphylatoxins (C3a, C5a) which are chemotactic and inflammatory peptides, and the phagocytosis pathway were down-regulated specifically in P2X7-deficient MdMs, but not in activated microglia from Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice during EAU. Interestingly, mice deficient for C3aR1 and C5aR1 are protected against EAU (52) and C3aR1 is increased in monocytes from patients with active Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease, a multisystemic autoimmune disease which is usually associated with uveitis (53). In addition, excessive activation of C3aR1 contributes to aberrant phagocytosis leading to synaptic loss and cognitive impairment in Alzheimer's disease (AD) mouse models and after viral infection (54, 55). Together, these data suggest that the protective effect of MP P2X7 deletion might at least in part be due to C3aR1 and C5aR1 down-regulation. Our findings support the notion that activation of the complement pathway in particular in MdMs contributes to MDM recruitment and retinal impairment during EAU.

Our results also showed that lack of P2X7 expression in MPs led to a decreased frequency of Th17 cells, which have been shown to play an important role in EAU (36). This indirect effect might be due to the decreased expression of the inflammasome pathway observed in P2X7-deficient MPs. Indeed, IL-1 is necessary for the differentiation of Th17 cells in EAE (37, 56). Similarly, mice with gain-of-function mutations in NLRP3 are characterized by high levels of IL-1 β production and a dominant Th17 response (57, 58). Thus, in EAU overexpression of the NLRP3 pathway in MPs induced by P2X7 activation could contribute to the polarization of Th17

cells. Additionally, the MP anaphylatoxin receptors might be involved in the Th17 shift. C3aR activation on monocytes contributes to Th17 polarization by increasing ATP release and subsequently activating NLRP3 (59). Moreover, C5aR activation on MPs drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune disease in arthritis (60) and lupus (61). Together, our data suggest that P2X7 indirectly controls Th17 polarization and that its absence in MPs could reduce the frequency of Th17 cells by decreasing the activation of the NLRP3 pathway and the expression of C3aR and C5aR on MPs.

In EAU microglia exhibit properties of antigen presenting cells (45) and have been shown to contribute to the recruitment of immune cells (46) but their roles are still ill-defined. To analyze P2X7-dependent transcriptional changes in microglia, we turned to scRNAseq of MPs, as microglial transcriptional changes are drowned in the bulk sequencing experiments due to the limited number of microglia and lower transcript levels compared to MdMs. First, we noticed that the gene expression profile of microglia shifted from a homeostatic state in naive mice to a pro-inflammatory state during EAU, expressing pro-inflammatory markers such as *ApoE*, consistent with data from the EAE model (41) but not the DAM signature present in models of neurodegenerative diseases. This EAU gene expression profile may be explained by the significant infiltration of MdMs and T-cells, creating a highly inflammatory environment that impacts the microglial polarization from a regenerative to a pathogenic state. In addition, we found that the absence of P2X7 in MPs reduced the population of IFN-responsive microglia (42). Biological processes related to the marker genes of IFN-responsive population include the IFN pathway, antigen processing and TNF production (Suppl Fig. 4 and Table 3), as observed in the IFN-responsive microglial population in the spinal cord of young mice post-injury (43). These data suggested that IFN-responsive microglia tend to be especially pro-inflammatory, promote the T-cell response, and take part to the development of EAU. However, the reduction observed may be linked to an indirect effect due to the lack of P2X7 in MdMs, leading to overall decreased cytokine production (in particular IFN), and not directly related to P2X7 expression in microglia. However, using *Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox}* mice we demonstrated that the deletion of P2X7 specifically in microglia decreased the severity of the disease, indicating that activation of P2X7 in microglia promotes its deleterious functions.

In conclusion, our comprehensive cell-specific analysis of P2X7 functions in EAU has revealed a pivotal role for P2X7 expression in MPs, orchestrating both innate and adaptive immune responses in autoimmune neuroinflammation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM, Sorbonne University, Union Nationale des Aveugles et Deficients Visuels (UNADEV), ANR PAON (ANR-23-CE14-0046-01), Programme Investissements d'Avenir IHU FOReSIGHT (ANR-18-IAHU-0001). The work described in this article was supported by the COST Action CA21130 "P2X receptors as a therapeutic opportunity (PRESTO)". We would like to thank also the Phenotypage Cellulaire et Tissulaire platform and the animal facility of the Institut de la Vision.

Bibliography

1. T. Gong, L. Liu, W. Jiang, R. Zhou, DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* **20**, 95-112 (2020).
2. F. Di Virgilio, D. Dal Ben, A. C. Sarti, A. L. Giuliani, S. Falzoni, The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**, 15-31 (2017).
3. D. Ferrari *et al.*, Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* **159**, 1451-1458 (1997).
4. D. Ferrari *et al.*, The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J* **14**, 2466-2476 (2000).
5. M. Barbera-Cremades *et al.*, P2X7 Receptor Induces Tumor Necrosis Factor-alpha Converting Enzyme Activation and Release to Boost TNF-alpha Production. *Frontiers in immunology* **8**, 862 (2017).
6. S. F. Moore, A. B. MacKenzie, NADPH oxidase NOX2 mediates rapid cellular oxidation following ATP stimulation of endotoxin-primed macrophages. *J Immunol* **183**, 3302-3308 (2009).
7. J. Hewinson, A. B. Mackenzie, P2X(7) receptor-mediated reactive oxygen and nitrogen species formation: from receptor to generators. *Biochemical Society transactions* **35**, 1168-1170 (2007).
8. C. M. Cruz *et al.*, ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* **282**, 2871-2879 (2007).
9. C. H. Shieh, A. Heinrich, T. Serchov, D. van Calker, K. Biber, P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-alpha in cultured mouse microglia. *Glia* **62**, 592-607 (2014).
10. L. E. B. Savio, P. de Andrade Mello, C. G. da Silva, R. Coutinho-Silva, The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Front Pharmacol* **9**, 52 (2018).
11. B. Rissiek, F. Haag, O. Boyer, F. Koch-Nolte, S. Adriouch, P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Frontiers in immunology* **6**, 204 (2015).
12. U. Schenk *et al.*, ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* **4**, ra12 (2011).
13. E. Martin *et al.*, New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol Psychiatry* **24**, 108-125 (2019).
14. K. Carvalho *et al.*, P2X7-deficiency improves plasticity and cognitive abilities in a mouse model of Tauopathy. *Prog Neurobiol* **206**, 102139 (2021).
15. J. M. Kanellopoulos, C. Delarasse, Pleiotropic Roles of P2X7 in the Central Nervous System. *Frontiers in cellular neuroscience* **13**, 401 (2019).
16. R. R. Caspi, A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* **120**, 3073-3083 (2010).
17. F. Willermain *et al.*, Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non-infectious uveitis. *Prog Retin Eye Res* **31**, 182-194 (2012).
18. D. A. Jabs, P. McCluskey, A. G. Palestine, J. E. Thorne, S. U. Nomenclatu, The standardisation of uveitis nomenclature (SUN) project. *Clin Exp Ophthalmol* **50**, 991-1000 (2022).
19. M. Solle *et al.*, Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* **276**, 125-132 (2001).
20. L. Douguet *et al.*, A small-molecule P2RX7 activator promotes anti-tumor immune responses and sensitizes lung tumor to immunotherapy. *Nature communications* **12**, 653 (2021).
21. Y. P. Rubtsov *et al.*, Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* **329**, 1667-1671 (2010).
22. S. Yona *et al.*, Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91 (2013).

23. M. J. Mattapallil *et al.*, Characterization of a New Epitope of IRBP That Induces Moderate to Severe Uveoretinitis in Mice With H-2b Haplotype. *Investigative ophthalmology & visual science* **56**, 5439-5449 (2015).
24. H. Xu *et al.*, A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Exp Eye Res* **87**, 319-326 (2008).
25. D. Wu *et al.*, ROAST: rotation gene set tests for complex microarray experiments. *Bioinformatics* **26**, 2176-2182 (2010).
26. D. Szklarczyk *et al.*, The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research* **45**, D362-D368 (2017).
27. L. Chen, C. F. Brosnan, Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R-/- mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* **176**, 3115-3126 (2006).
28. C. Matute *et al.*, P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* **27**, 9525-9533 (2007).
29. A. J. Sharp *et al.*, P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* **5**, 33 (2008).
30. A. Takeda *et al.*, Crucial role of P2X7 receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis. *Japanese journal of ophthalmology* **62**, 398-406 (2018).
31. J. Zhao, M. Chen, H. Xu, Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)-related tissue damage and angiogenesis is reduced in CCL2(-)/(-)CX(3)CR1gfp/gfp mice. *Investigative ophthalmology & visual science* **55**, 7572-7582 (2014).
32. C. Acuna-Castillo *et al.*, P2X7 Receptor in Dendritic Cells and Macrophages: Implications in Antigen Presentation and T Lymphocyte Activation. *Int J Mol Sci* **25**, (2024).
33. B. Gu, L. J. Bendall, J. S. Wiley, Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92**, 946-951 (1998).
34. F. Aswad, H. Kawamura, G. Dennert, High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* **175**, 3075-3083 (2005).
35. S. Hubert *et al.*, Extracellular NAD+ shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* **207**, 2561-2568 (2010).
36. D. Luger *et al.*, Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* **205**, 799-810 (2008).
37. C. Sutton, C. Brereton, B. Keogh, K. H. Mills, E. C. Lavelle, A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **203**, 1685-1691 (2006).
38. E. G. O'Koren *et al.*, Microglial Function Is Distinct in Different Anatomical Locations during Retinal Homeostasis and Degeneration. *Immunity* **50**, 723-737 e727 (2019).
39. C. C. Brown *et al.*, Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell* **179**, 846-863 e824 (2019).
40. R. C. Paolicelli *et al.*, Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* **110**, 3458-3483 (2022).
41. S. Krasemann *et al.*, The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* **47**, 566-581 e569 (2017).
42. B. A. Friedman *et al.*, Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep* **22**, 832-847 (2018).
43. A. F. M. Salvador *et al.*, Age-dependent immune and lymphatic responses after spinal cord injury. *Neuron* **111**, 2155-2169 e2159 (2023).
44. H. Keren-Shaul *et al.*, A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **169**, 1276-1290 e1217 (2017).

45. D. A. Lipski *et al.*, MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation* **14**, 136 (2017).
46. Y. Okunuki *et al.*, Retinal microglia initiate neuroinflammation in ocular autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 9989-9998 (2019).
47. C. Yu, C. Roubeyx, F. Sennlaub, D. R. Saban, Microglia versus Monocytes: Distinct Roles in Degenerative Diseases of the Retina. *Trends Neurosci* **43**, 433-449 (2020).
48. R. Zhao, D. Liang, D. Sun, Blockade of Extracellular ATP Effect by Oxidized ATP Effectively Mitigated Induced Mouse Experimental Autoimmune Uveitis (EAU). *PLoS One* **11**, e0155953 (2016).
49. C. Delarasse, R. Auger, P. Gonnord, B. Fontaine, J. M. Kanellopoulos, The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **286**, 2596-2606 (2011).
50. C. Garbers *et al.*, 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. *J Biol Chem* **286**, 14804-14811 (2011).
51. C. de Torre-Minguela, M. Barbera-Cremades, A. I. Gomez, F. Martin-Sanchez, P. Pelegrin, Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. *Scientific reports* **6**, 22586 (2016).
52. L. Zhang *et al.*, Complement anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR are required in the pathogenesis of experimental autoimmune uveitis. *Journal of leukocyte biology* **99**, 447-454 (2016).
53. C. Wang *et al.*, Increased Complement 3a Receptor is Associated with Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Scientific reports* **7**, 15579 (2017).
54. A. Litvinchuk *et al.*, Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron* **100**, 1337-1353 e1335 (2018).
55. M. J. Vasek *et al.*, A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* **534**, 538-543 (2016).
56. Y. Chung *et al.*, Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576-587 (2009).
57. G. Meng, F. Zhang, I. Fuss, A. Kitani, W. Strober, A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity* **30**, 860-874 (2009).
58. S. D. Brydges *et al.*, Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity* **30**, 875-887 (2009).
59. E. Asgari *et al.*, C3a modulates IL-1beta secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* **122**, 3473-3481 (2013).
60. M. Hashimoto *et al.*, Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* **207**, 1135-1143 (2010).
61. S. Pawaria *et al.*, Complement component C5a permits the coexistence of pathogenic Th17 cells and type I IFN in lupus. *J Immunol* **193**, 3288-3295 (2014).

Figures

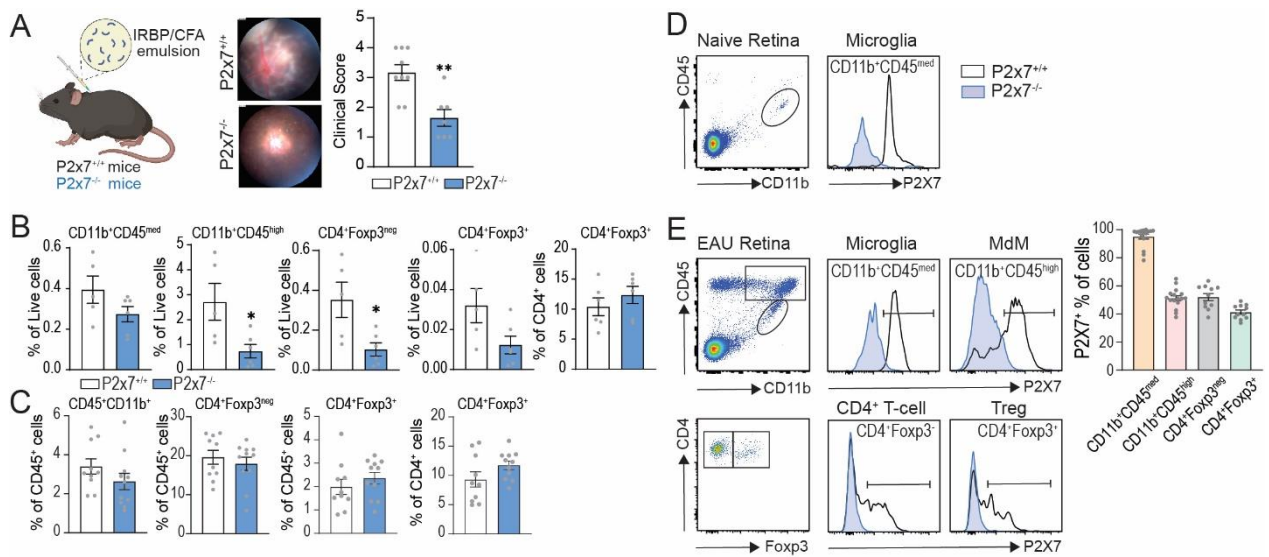


Figure 1: P2X7 deficiency decreases the severity of EAU.

P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice were immunized, or not (naïve), with 200 µg IRBP₆₅₁₋₆₇₀ peptide and injected with 1 µg Pertussis Toxin (PTX). (A) Representative fundus images and clinical scores of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice 12 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=9 for P2x7^{+/+} and n=7 for P2x7^{-/-}, **p=0.005). The data shown are representative of four independent experiments. (B) Bars represent the percentages of immune cells in the retina: CD11b⁺CD45^{med} (Microglia), CD11b⁺CD45^{high} (monocyte-derived macrophages (MdMs)), CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} (CD4⁺ T cells) and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ (Tregs), 13 days after immunization. Each dot represents one retina (n=5 for P2x7^{+/+} and n=6 for P2x7^{-/-}, CD11b⁺CD45^{high} *p=0.030, CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} *p=0.035). (C) Bars represent the percentages of immune cells in the cervical lymph nodes 13 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=10 for P2x7^{+/+} and n=11 for P2x7^{-/-}). Data were analyzed by Mann–Whitney test and are expressed as mean ± SEM. (D) Cells from the retinas of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} naïve mice were analyzed by flow cytometry. Live cells were gated on CD11b⁺CD45^{med} (Microglia) (left panel) and a representative plot of P2X7 expression is shown (right panel). (E) After 13 days, cells from the retinas of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} immunized mice were analyzed by flow cytometry. Live cells were gated on CD11b⁺CD45^{med} (Microglia), CD11b⁺CD45^{high} (MdMs), CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} (CD4⁺ T cells), and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ (Tregs) to evaluate P2X7 expression on each subset. Representative plots of gating and P2X7 expression in the retina of EAU mice are shown (left

panel). The percentage of P2X7⁺ cells for each cell subset is shown in a bar graph (right panel), each dot represents one retina (n=16 for CD11b⁺ cells and n=11 for CD4⁺ cells).

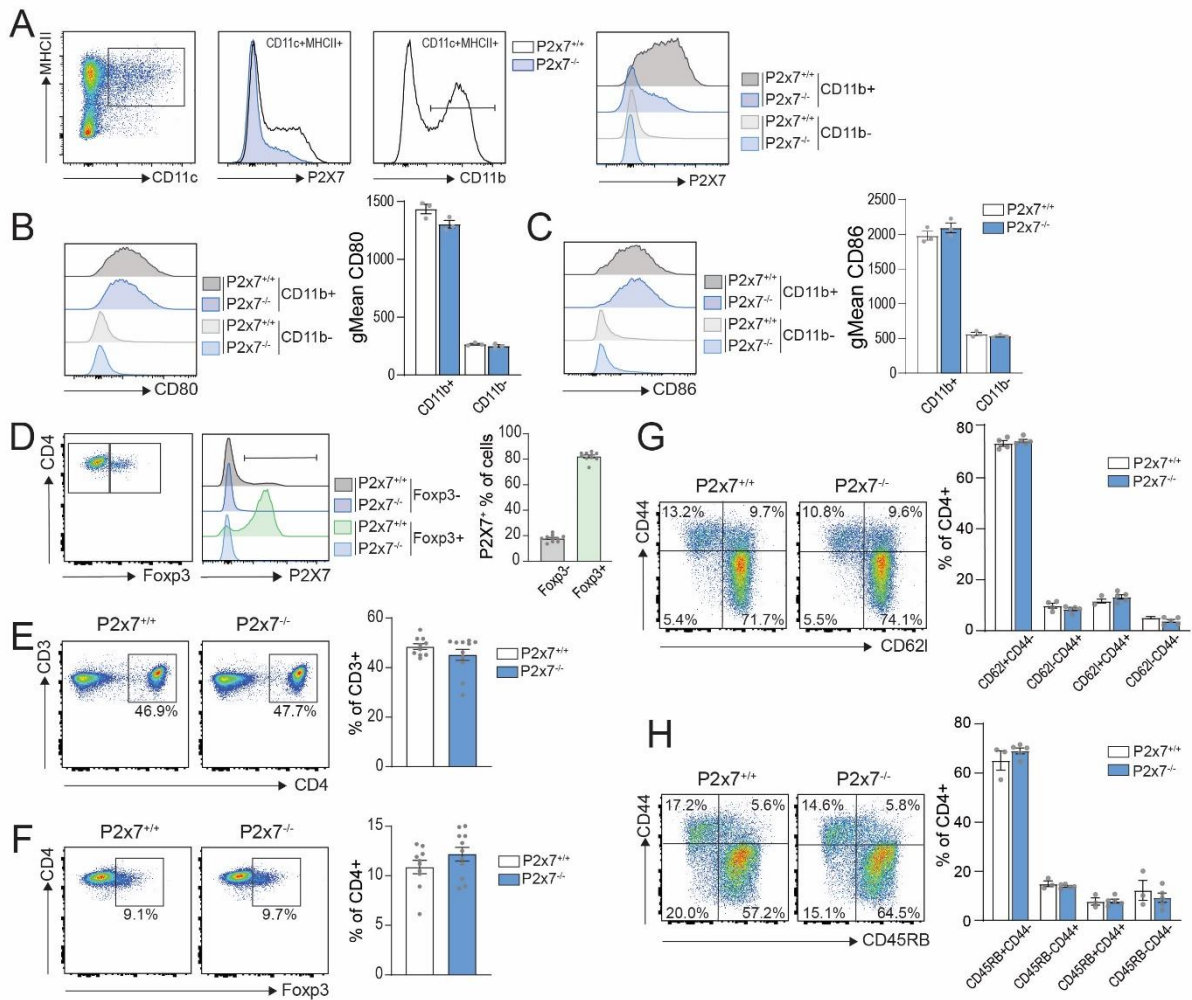


Figure 2. P2X7 deficiency does not affect dendritic cell (DC) and CD4⁺ T cell activation

P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice were immunized with 200 μ g IRBP₆₅₁₋₆₇₀ peptide. Inguinal lymph nodes were collected 10 days post-immunization. (A) DCs were defined as MHCII⁺CD11c⁺ (left panel). Representative plots of P2X7 and CD11b expression for MHCII⁺CD11c⁺ cells are shown (middle panel). Representative plots of P2X7 expression for each subset MHCII⁺CD11c⁺CD11b^{+/-} are shown (right panel). Representative plots of CD80 (B) and CD86 (C) expression for each subset are shown (left panel). Quantification of the expression of co-stimulatory molecules CD80 (B) and CD86 (C) for each subset is shown (right panel), each dot represents pooled cells from 3 mice (n=3 for P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-}). (D) Representative plots of P2X7 expression by CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} (CD4⁺ T cells) and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ (Regulatory T cells) in the lymph nodes (left panel). The percentage of P2X7⁺ cells for each subset is shown (right panel), each dot represents one mouse (n=10). (E-F) Gating of P2X7⁺ cells for subsets of T cells (right panels). Bars represent the percentages of CD3⁺CD4⁺ T cells (E) and CD4⁺Foxp3⁺ T cells (F) in the lymph nodes, each dot represents one mouse (n=5 for P2x7^{+/+} and n=4 for P2x7^{-/-}). Expression of cell

activation markers by CD4⁺ T cells was evaluated by flow cytometry. CD4⁺ T cells were gated on CD44⁻CD62I⁺ or CD44⁻CD45RB⁺ (naïve T cells), CD44⁺CD62I⁺ or CD44⁺CD45RB⁺ (central memory T cells), and CD44⁺CD62I⁻ or CD44⁺CD45RB⁻ (effector T cells) (G and H). Each dot represents represent pool cells from 2-3 mice (n=3-4 for P2x7^{+/+} and n=5 for P2x7^{-/-} mice). Data were analyzed by multiple Mann–Whitney tests and are expressed as mean ± SEM.

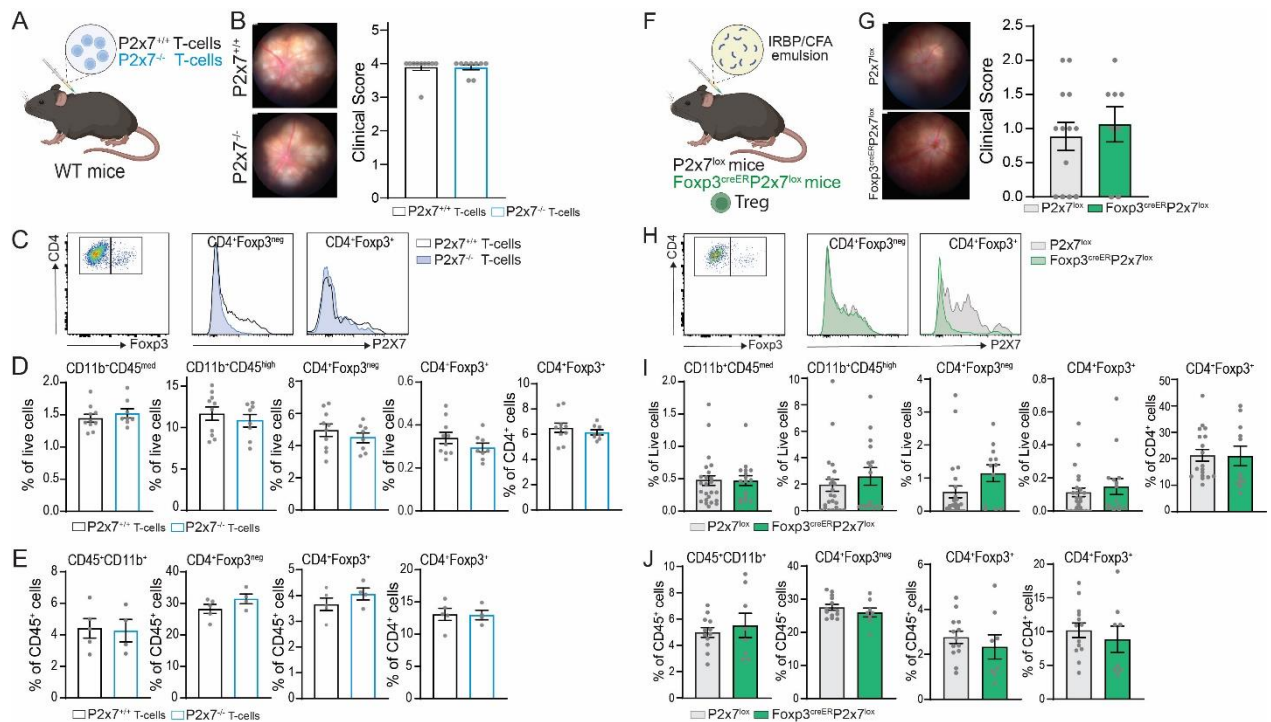


Figure 3. Lack of P2X7 expression in CD4⁺ T cells does not alter their functions during EAU.

(A) EAU was induced in WT mice by adoptive transfer of IRBP-specific T lymphocytes from spleens and lymph nodes of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice. (B) Representative fundus images and clinical scores of WT recipient mice 4 days after adoptive transfer of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} T cells. Each dot represents one mouse (n=10 for P2x7^{+/+} and n=9 for P2x7^{-/-}). The data shown are representative of three independent experiments. (C) Representative plots of P2X7 expression by CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} (CD4⁺ T cells) and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ (Regulatory T cells) in the retinas of WT mice after adoptive transfer of P2x7^{+/+} or P2x7^{-/-} T cells. (D) Bars represent the percentages of immune cells in the retina 6 days after adoptive transfer. Each dot represents one retina (n=10 for P2x7^{+/+} and n=8 for P2x7^{-/-}). (E) Bars represent the percentages of immune cells in the cervical lymph nodes, 6 days after adoptive transfer. Each dot represents one mouse (n=5 for P2x7^{+/+} and n=4 for P2x7^{-/-}).

(F) P2x7^{lox} and Foxp3^{creER}P2x7^{lox} mice were immunized with 200μg IRBP₆₅₁₋₆₇₀ peptide and injected with 1μg PTX, one week after the end of tamoxifen treatment. (G) Representative fundus images and clinical scores of P2x7^{lox} and Foxp3^{creER}P2x7^{lox} 12 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=13 for P2x7^{lox} and n=8 for Foxp3^{creER}P2x7^{lox}). The data shown are representative of four independent experiments. (H) Representative plots of P2X7 expression by CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} (CD4⁺ T cells) and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ (Regulatory T cells) in the

retinas of P2x7^{lox} and Foxp3^{creER}P2x7^{lox} mice 13 days after immunization. (I) Bars represent the percentages of immune cells in the retina 13 days after immunization. Each dot represents one retina (n=26 for P2x7^{lox} and n=16 for Foxp3^{creER}P2x7^{lox}). (J) Bars represent the percentages of immune cells in the cervical lymph nodes, 13 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=13 for P2x7^{lox} and n=8 for Foxp3^{creER}P2x7^{lox}). Data were analyzed by Mann–Whitney test and are expressed as mean ± SEM.

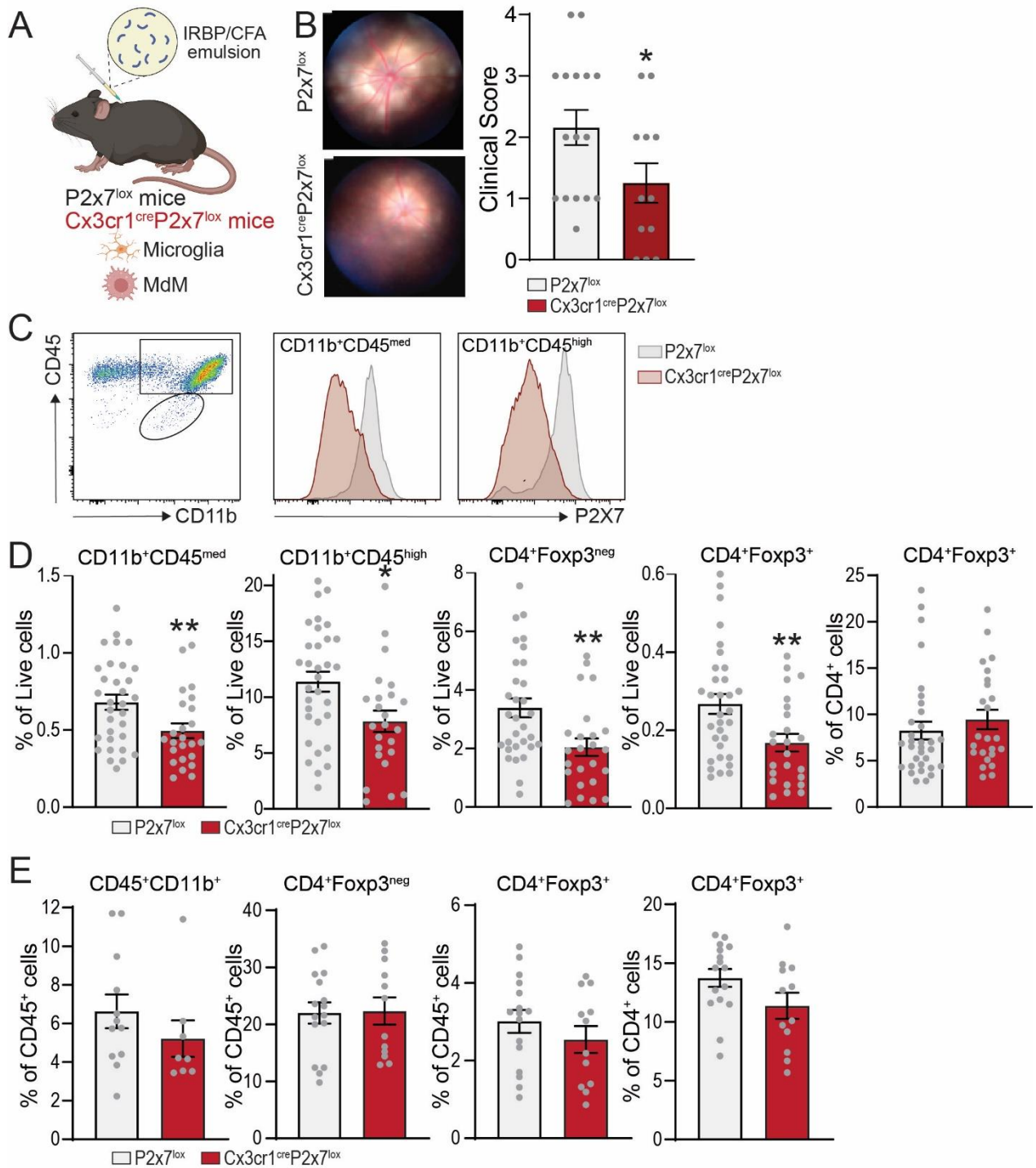


Figure 4. P2X7 deficiency in resident microglial cells and infiltrating MDMs reduces the severity of EAU.

(A) P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice were immunized with 200µg IRBP651-670 peptide and injected with 1µg Pertussis Toxin (PTX). (B) Representative fundus images and clinical scores of P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} 12 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=16 for P2x7^{lox} and n=12 for Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice, *p=0.044). The data shown are representative

of at least five independent experiments. C) Representative plots of P2X7 expression by CD11b⁺CD45^{med} (Microglia) and CD11b⁺CD45^{high} (Infiltrating MDM) in the retinas of P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice 13 days after immunization. (D) Bars represent the percentages of immune cells in the retina 13 days after immunization. Each dot represents one retina (P2x7^{lox} (n=32) vs Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice (n=24); CD11b⁺CD45^{med} **p=0.006, CD11b⁺CD45^{high} *p=0.011, CD3⁺CD4⁺Foxp3^{neg} **p=0.003 and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ **p=0.006). (E) Bars represent the percentages of immune cells in the cervical lymph nodes, 13 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=16 for P2x7^{lox} and n=12 for Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice). Data were analyzed by Mann–Whitney test and are expressed as mean ± SEM.

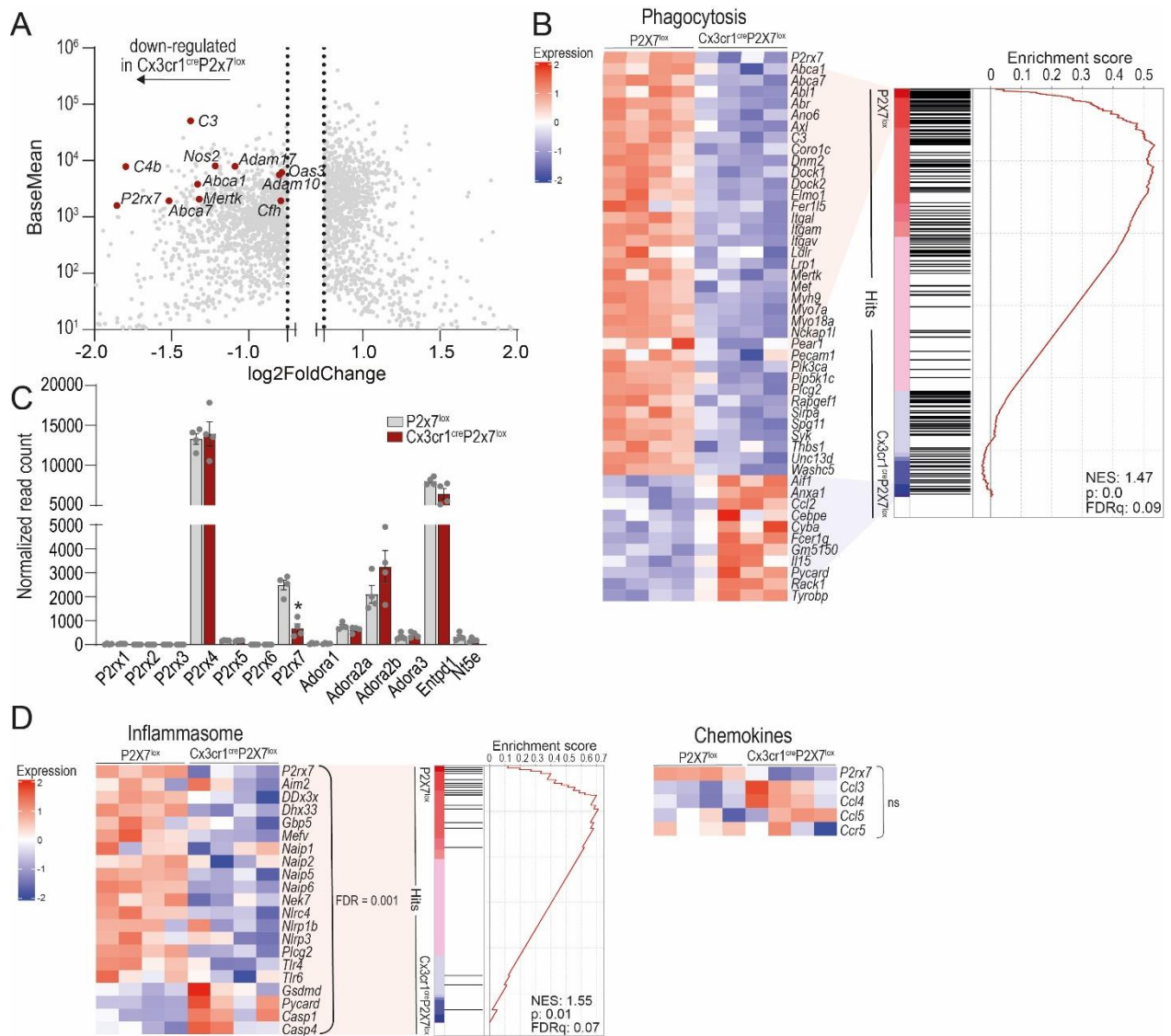


Figure 5. P2X7 deficiency in resident microglial cells and infiltrating MDMs decreases the expression of inflammatory-related genes during EAU.

(A) Volcano plot showing significantly differentially regulated genes between CD45⁺CD11b⁺ cells from the retina of P2x7^{lox} (n=4) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice (n=4) 13 days after immunization. (B) Heatmap and GSEA cluster of genes belonging to the phagocytosis pathway (Goterm GO0006909) in CD45⁺CD11b⁺ cells from the retina of P2x7^{lox} (n=4) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice (n=4) developing EAU. (C) Bars showing the expression of P2x and P1 receptors, and ectonucleotidases in CD45⁺CD11b⁺ cells from the retina of P2x7^{lox} (n=4) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice (n=4). (D) Heatmap and GSEA cluster of genes belonging to the inflammasome pathway (left panel) and chemokine family (right panel) in CD45⁺CD11b⁺ cells from the retina of P2x7^{lox} (n=4) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice (n=4) developing EAU.

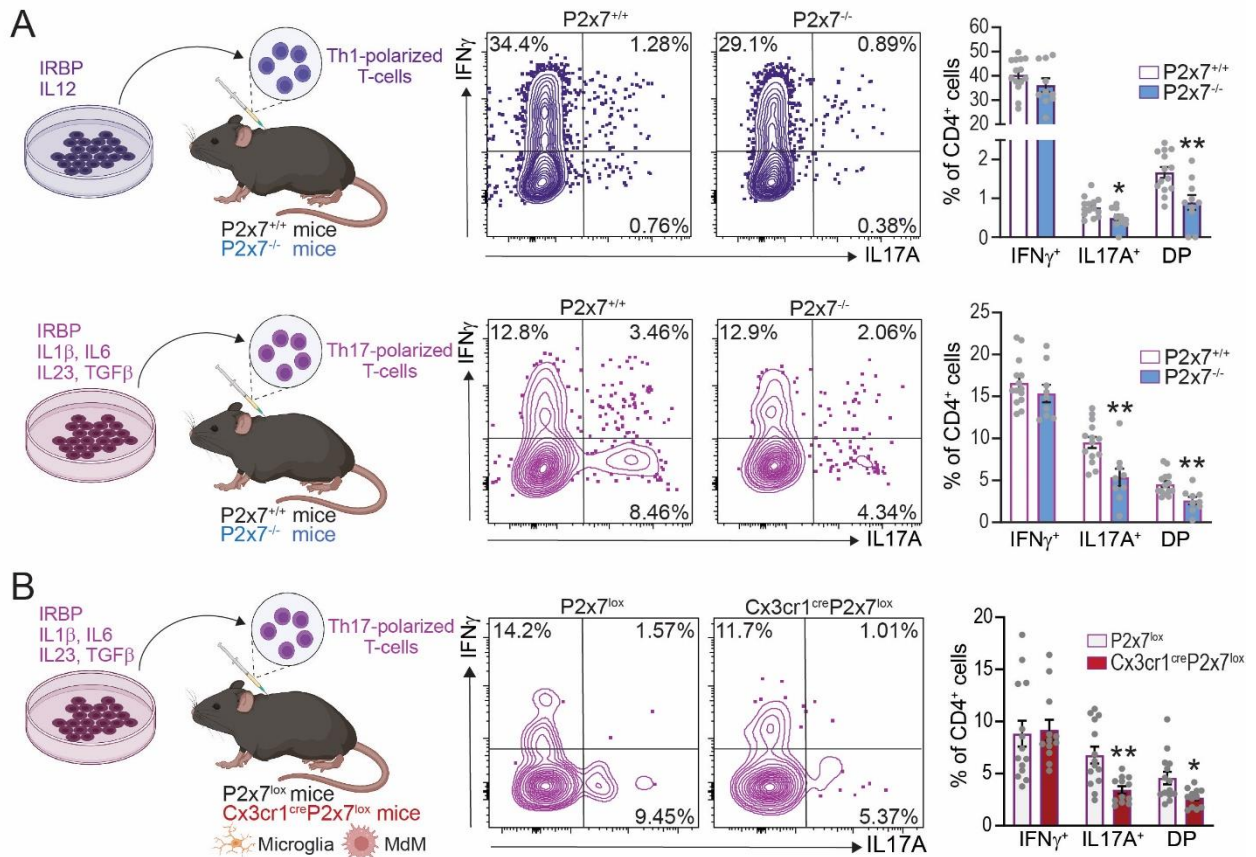


Figure 6. P2X7 deficiency in MDMs affects the polarization of CD4⁺ T cells during EAU

(A) EAU was induced in P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice by adoptive transfer of IRBP-specific T lymphocytes from spleens and lymph nodes of WT mice polarized to Th1 with IL12 or to Th17 with IL-6, IL-23, IL-1 β and TGF- β (left panel). At day 6 after adoptive transfer, cells from the retina were collected and analyzed by flow cytometry. Representative plots of IFN γ and IL17A expression by CD4⁺ T cells in the retinas of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice after adoptive transfer of Th1 or Th17 polarized T cells. Bars represent the percentages of IFN γ ⁺, IL17A⁺, or double positive (DP) CD4⁺ T cells in the retina 6 days after adoptive transfer. Each dot represents one retina (Th1: n=14 for P2x7^{+/+} and n=10 for P2x7^{-/-}, IL17A⁺ *p=0.023 and DP **p=0.004; Th17: n=14 for P2x7^{+/+} and n=9 for P2x7^{-/-}, IL17A⁺ **p=0.002 and DP **p=0.002). (B) EAU was induced in P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice by adoptive transfer of IRBP-specific T lymphocytes from the spleens and lymph nodes of WT mice polarized to Th17 with IL-6, IL-23, IL-1 β and TGF- β (left panel). At day 6 after adoptive transfer, cells from the retina were collected and analyzed by flow cytometry. Representative plots of IFN γ and IL17A expression by CD4⁺ T cells in the retinas of P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice after adoptive transfer of Th17 polarized T-cells. Bars represent the percentages of IFN γ ⁺, IL17A⁺ or DP CD4⁺ T cells in the retina 6 days after

adoptive transfer. Each dot represents one retina (n=14 for P2x7^{lox} and n=12 for Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox}, IL17A⁺ **p=0.001 and DP *p=0.013). Data were analyzed by multiple Mann–Whitney tests and are expressed as mean ± SEM.

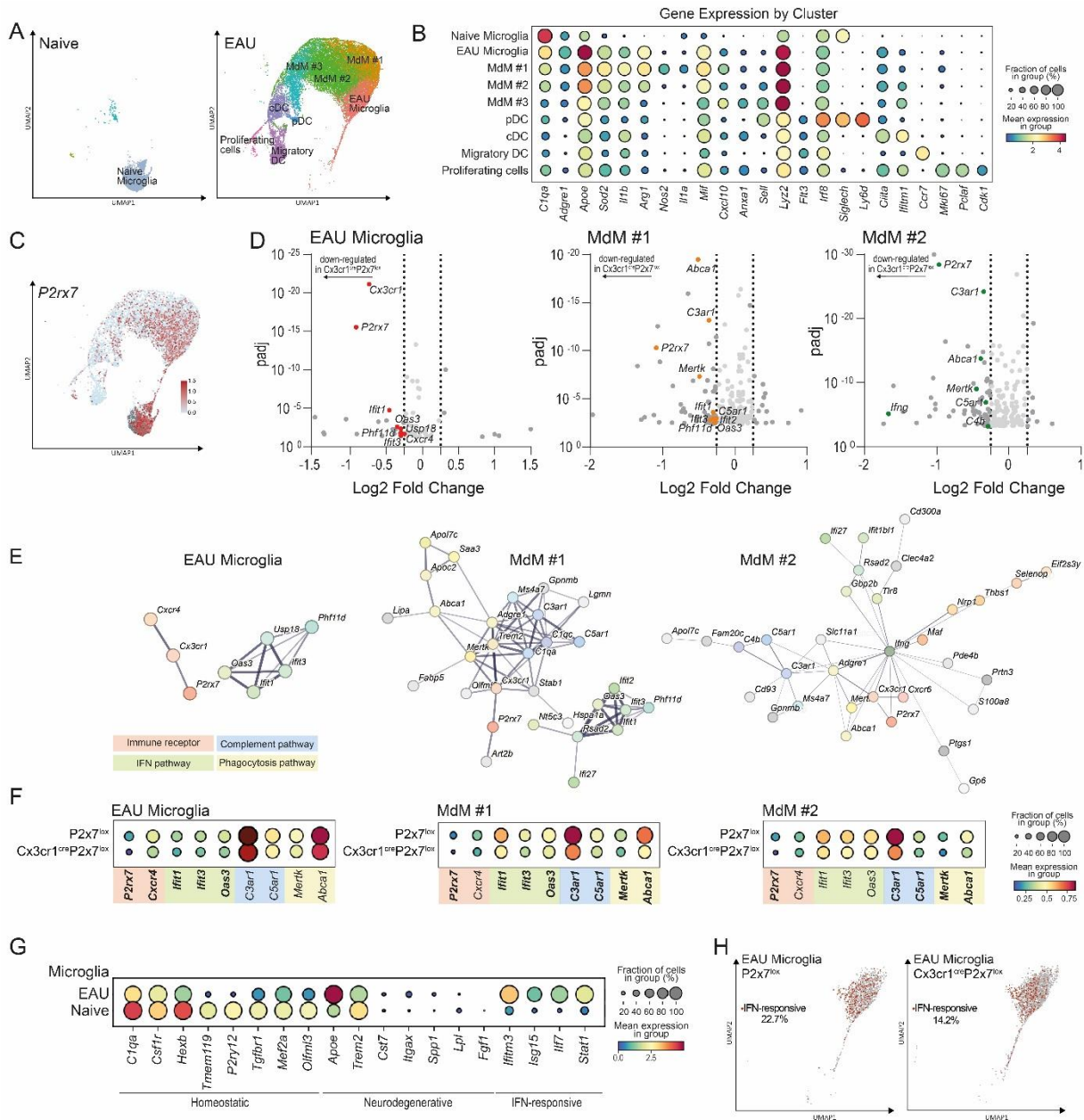


Figure 7. Microglia and infiltrating MDM subpopulations in the retina are differentially modified by lack of P2X7 during EAU.

Single-cell RNA sequencing analysis of CD11b⁺ cells from the retina of naive WT mice, P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice 13 days after immunization. (A) UMAP representation of CD11b⁺ cell populations from the retina of naive WT mice and P2x7^{lox} mice during EAU. (B) CD11b⁺ cell population marker (x axis) expression levels for the 9 CD11b⁺ cell populations (y axis). Size of dots represents the fraction of cells expressing the marker, and color intensity indicates mean normalized scaled expression levels. (C) Feature plot showing P2x7 expression projected onto the UMAP representation of CD11b⁺ cell populations from the retinas of naive WT mice and

P2x7^{lox} mice during EAU. (D) Volcano plot showing significantly differentially regulated genes in microglia, MdM#1, and MdM#2 subpopulations from P2x7^{lox} vs Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice developing EAU. (E) Full STRING Network of genes differentially expressed in CD11b⁺ cells from the retinas of P2x7^{lox} vs Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} cells in clusters microglia, MdM#1, and MdM#2 clusters. The edges indicate both functional and physical protein associations. Line thickness indicates the strength. (F) Dot plots showing normalized transcript expression distribution on a per cluster basis for genes that were differentially expressed in CD11b⁺ cells from the retinas of P2x7^{lox} vs Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice. Size of dots represents the fraction of cells expressing the marker, and color intensity indicates mean normalized scaled expression levels. Significantly differentially regulated genes are in bold. (G) Dot plot showing homeostatic, neurodegenerative, and IFN-responsive associated gene (x-axis) expression levels for naive and EAU microglial populations (y axis). Size of dots represents the fraction of cells expressing the gene, and color intensity indicates mean normalized scaled expression levels. (H) Feature plots showing microglial cells expressing the IFN-responsive transcriptional signature (*Ifit3*, *Oas3*, *Ifitm3*, *Isg15*, *Irf7* and *Stat1*) projected onto the UMAP representation of the microglial population from the retina of P2x7^{lox} (left) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} (right) mice during EAU.

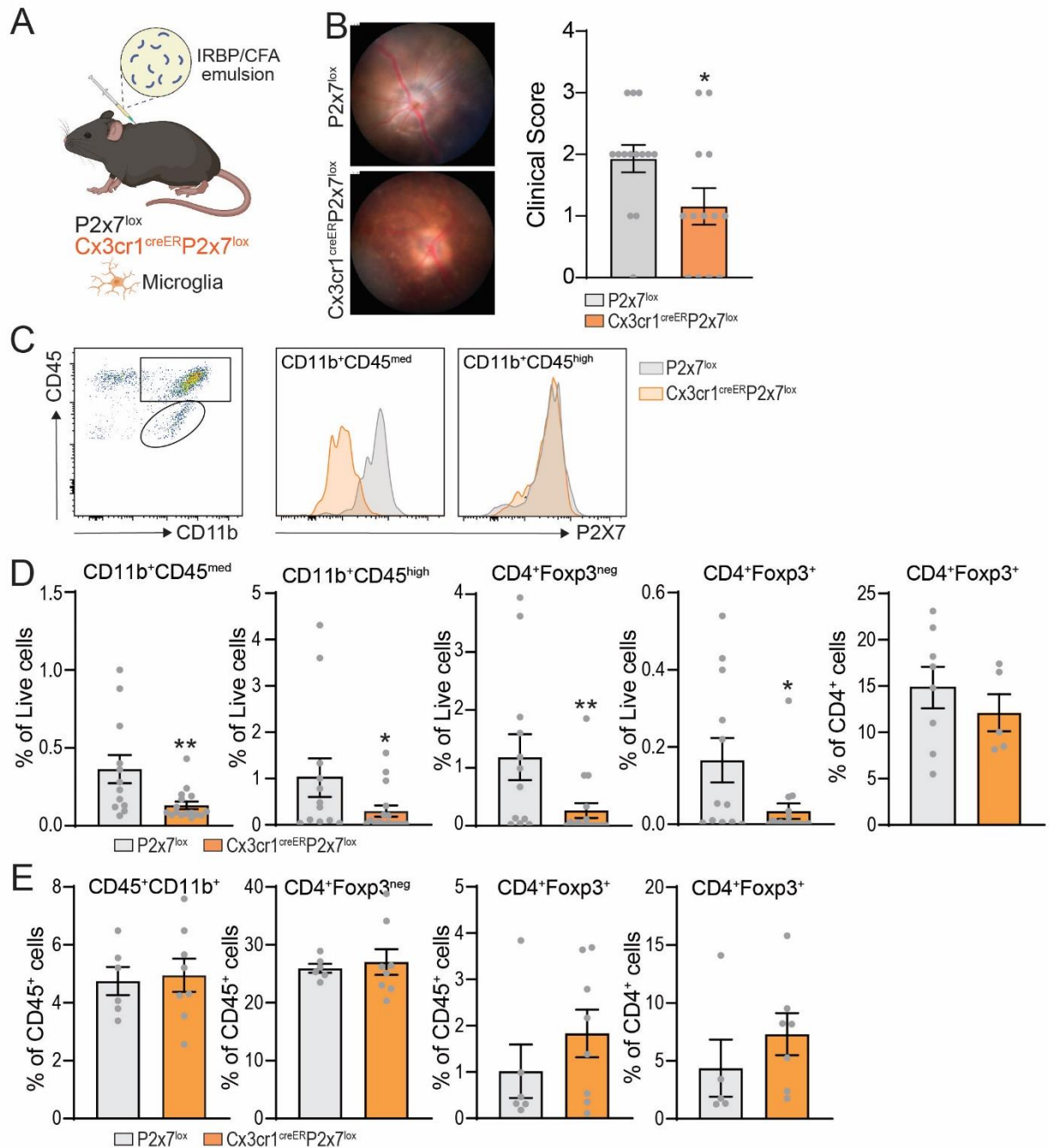
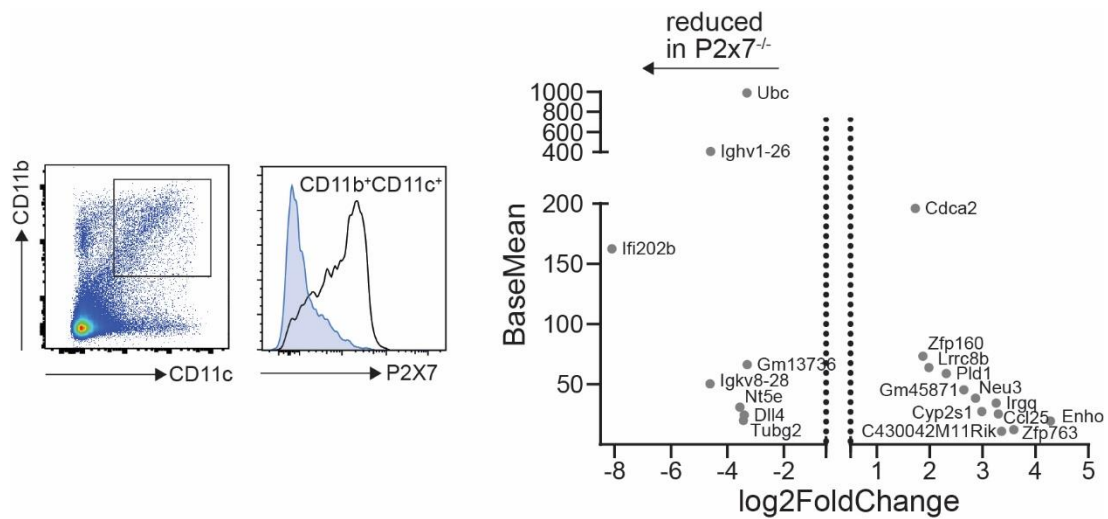


Figure 8. P2X7 deficiency on resident microglia is sufficient to reduce the severity of EAU

(A) $P2x7^{lox}$ and $Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox}$ mice were immunized with $200\mu\text{g}$ IRBP₆₅₁₋₆₇₀ peptide and injected with $1\mu\text{g}$ Pertussis Toxin (PTX). (B) Representative fundus images and clinical scores of $P2x7^{lox}$ and $Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox}$ 12 days after immunization. Each dot represents one mouse ($n=14$ for $P2x7^{lox}$ and $n=13$ for $Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox}$ mice, $*p=0.042$). The data shown are representative of three independent experiments. (C) Representative plots of P2X7 expression by $CD11b^{+}CD45^{med}$ (Microglia) and $CD11b^{+}CD45^{high}$ (Infiltrating MDM) in the retinas of $P2x7^{lox}$ and

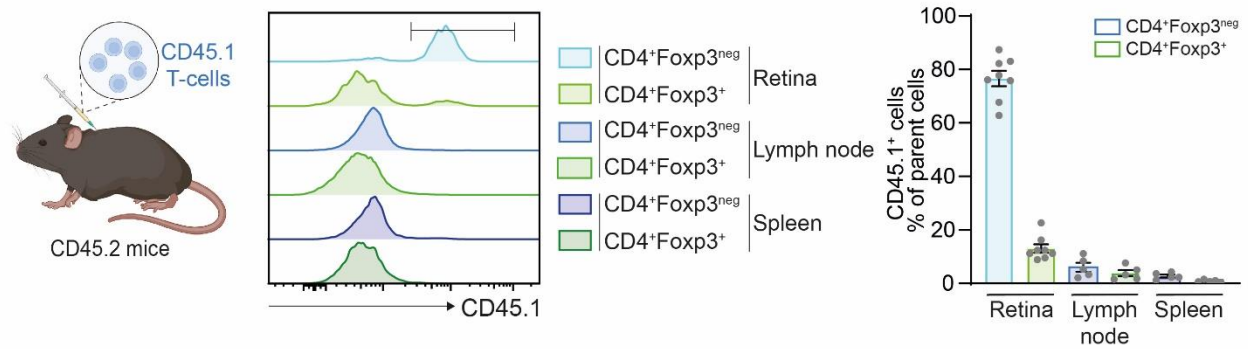
Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice 13 days after immunization. (D) Bars represent the percentages of immune cells in the retina 13 days after immunization. Each dot represents one retina (P2x7^{lox} (n=12) vs Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice (n=16); CD11b⁺CD45^{med} **p=0.009, CD11b⁺CD45^{high} *p=0.032, CD4⁺Foxp3^{neg} **p=0.005 and CD4⁺Foxp3⁺ *p=0.019). (E) Bars represent the percentages of immune cells in the cervical lymph nodes, 13 days after immunization. Each dot represents one mouse (n=6 for P2x7^{lox} and n=8 for Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox} mice). Data were analyzed by Mann–Whitney test and are expressed as mean ± SEM.

Supplementary figures



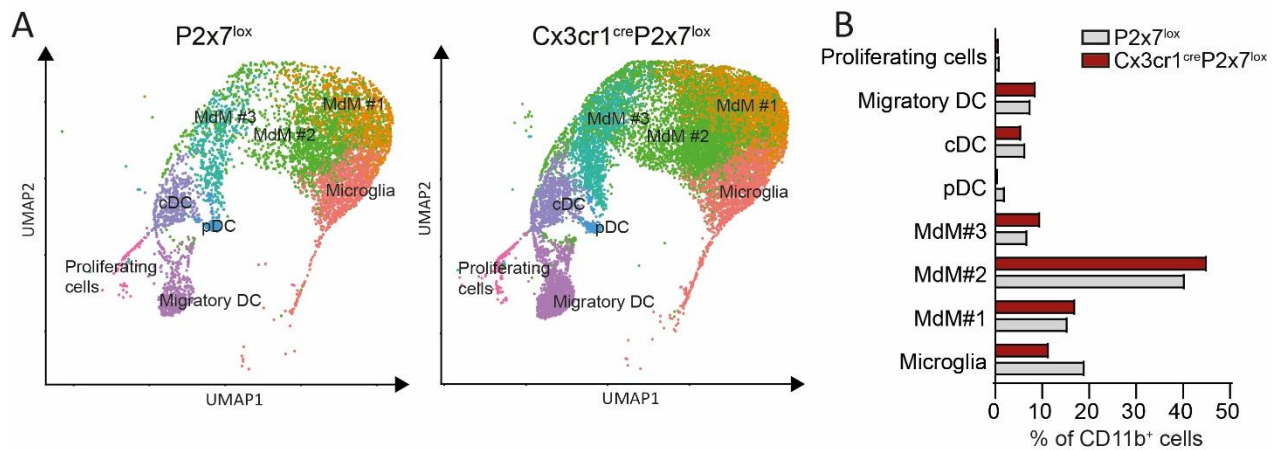
Supplementary Figure 1: RNA sequencing analysis of CD11c⁺CD11b⁺ cells from P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice

P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice were immunized with 200 µg IRBP₆₅₁₋₆₇₀ peptide. After 10 days, lymph nodes cells were collected, CD11c⁺CD11b⁺ cells were sorted by flow cytometry (left panel) and RNAseq analysis was performed. Volcano plot showing significantly differentially regulated genes between CD11c⁺CD11b⁺ cells from the lymph nodes of P2x7^{+/+} and P2x7^{-/-} mice (right panel).



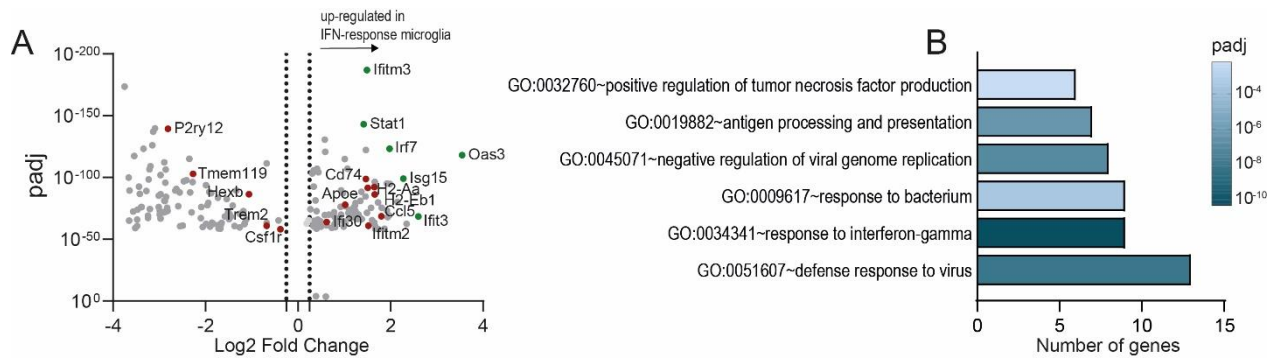
Supplementary Figure 2. Analysis of donor T cells in the retina, lymph node, and spleen during adoptive EAU.

CD45.1 donor mice were immunized with 200 μ g IRBP₆₅₁₋₆₇₀ in PBS emulsified in CFA. After 10 days, spleen and draining lymph nodes cells were collected and cultured with IRBP₆₅₁₋₆₇₀ at 25 μ g/mL and IL-12 at 5ng/mL for 72h then retrieved and adoptively transferred to CD45.2 recipient mice (n=8). At day 6 after adoptive transfer, cells from the retina, the cervical lymph nodes, and the spleen were collected and analyzed by flow cytometry. Effector T cells were identified as CD4⁺Foxp3^{neg} and regulatory T cells were identified as CD4⁺Foxp3⁺. Representative plots of CD45.1 expression are shown for each subset in the retina, the lymph nodes, and the spleen (left panel). Bars show the percentage of CD45.1⁺ (donor) cells in CD4⁺Foxp3^{neg} or CD4⁺Foxp3⁺ cell populations (right panel).



Supplementary Figure 3. Repartition of the CD11b⁺ cell subpopulations from the retinas of P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice analyzed by scRNAseq

(A) UMAP representation of CD11b⁺ cell subpopulations from the retina of P2x7^{lox} (6596 cells) and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} (17627 cells) mice 13 days after immunization. (B) Bar plot showing the percentage of each CD11b⁺ subpopulation in the retinas of P2x7^{lox} and Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} mice following EAU as a percentage of all CD11b⁺ cells.



Supplementary Figure 4. Transcriptomic profile of the IFN-responsive microglia subpopulation in the retinas of mice developing EAU

(A) Volcano plot showing significantly differentially regulated genes between IFN-responsive microglia and other microglia subpopulations from the retina of naïve and EAU mice (Green dots: IFN-responsive marker genes). (B) Gene ontology (GO) terms associated with upregulated genes in IFN-responsive microglia.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons analysé le rôle de P2X7 exprimé par les cellules immunitaires impliquées dans le développement de l'EAU et avons montré le rôle central des MPs exprimant P2X7. L'absence d'expression de P2X7 par ces cellules conduit à une diminution de l'expression de molécules pro-inflammatoires, incluant l'inflammasome NLRP3 et certains éléments du complément. La délétion de P2X7 sur les cellules T n'entraîne aucune modification du phénotype de la maladie. En revanche, l'expression de P2X7 par les MPs influe de façon indirecte sur le phénotype des cellules Th17. De plus, l'absence de P2X7 sur les MPs provoque une diminution significative de la proportion de la sous-population de microglie sensible à l'IFN- γ . L'ensemble de ces données soutient que l'activation de P2X7 sur les MPs contrôle le phénotype des lymphocytes T autoréactifs, en plus de favoriser des processus pro-inflammatoires au sein de ces MPs.

En accord avec de précédentes études (Takeda et al., 2018 ; Zhao et al., 2016), nous avons montré que la délétion systémique de P2X7 protège contre le développement de l'EAU et diminue l'inflammation rétinienne. Dans l'EAE, des résultats divergents sont observés dans deux modèles de souris P2X7^{-/-} et l'une des hypothèses avancées est la persistance de l'expression de P2X7 par les cellules T (Rissiek et al., 2015 ; Kanellopoulos et Delarasse 2019). Dans le modèle d'EAU, nous avons montré que l'absence d'expression de P2X7 par les cellules T CD4⁺ n'impacte pas de façon significative leur activation ainsi que leur pathogénicité. Les Tregs sont particulièrement susceptibles à l'apoptose dépendante de P2X7 (Aswad et al., 2005) suggérant que l'absence de P2X7 dans ces cellules pourrait modifier la proportion de Tregs au sein de la population de lymphocytes T CD4⁺. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons délété de manière spécifique P2X7 dans les Tregs. Nous n'avons pas observé de variations de la proportion de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs ou régulateurs dans la rétine. Bien que 80 % des Tregs expriment P2X7 dans les ganglions lymphatiques drainants, il est probable que les concentrations d'ATP ne soient pas assez élevées pour activer les fonctions des cellules T CD4⁺ dépendantes de P2X7. Dans le cas de l'EAU, nous avons observé une diminution de l'expression de P2X7 par les Tregs dans la rétine (seulement 40 % des Tregs expriment P2X7). Dans l'EAU, les quantités d'ATP extracellulaire à l'intérieur de la rétine augmentent du fait de la mort des photorécepteurs ce qui est favorable à l'activation de P2X7. Il est possible que cette diminution de l'expression de P2X7 par les Tregs les rendent moins susceptibles à l'apoptose induite par P2X7.

Nos travaux montrent un rôle majeur des MPs exprimant P2X7 dans le développement de l'EAU. Nous avons montré que la délétion de P2X7 sur les MPs réduit la sévérité de l'EAU ainsi que l'infiltration immunitaire rétinienne. Les analyses transcriptomiques des MPs de rétines de souris développant une EAU montrent que la perte de P2X7 dans ces cellules est liée à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la phagocytose et appartenant à des voies de signalisation de l'inflammation. Plusieurs de ces médiateurs de l'inflammation sont connus pour être impliqués dans la pathophysiologie de

modèles de maladies auto-immunes, en particulier la voie de l'inflammasome dépendante de P2X7 responsable de la production et de la libération de l'IL-1 β et de l'IL-18 (Di Virvilio et al., 2017). Il est important de noter que l'expression des métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 est diminuée dans les MPs P2X7^{-/-}, reflétant le rôle connu de P2X7 dans le clivage des protéines de surface CD62L (Gu et al., 1998), APP (Delarasse et al., 2011), IL-6R (Garbers et al., 2011) et TNF- α (Barbera-Cremades et al., 2017 ; Shieh et al., 2014 ; de Torre-Minguela et al., 2016). Ainsi, la diminution de l'expression de ces protéases pourrait conduire à une diminution des niveaux de TNF- α . De plus, nous avons observé une diminution de l'expression de certains composants du système du complément, à savoir C4b et C3, ce dernier étant clivé en C3a et C3b. Ainsi, dans l'EAU, l'activation de P2X7 à la surface des MPs induirait la production et la libération de médiateurs de l'inflammation, contribuant à la formation d'un microenvironnement pro-inflammatoire et à la destruction tissulaire.

Nos analyses de scRNAseq montrent que les récepteurs aux anaphylatoxines C3a et C5a (C3aR1, C5aR1) sont downrégulés spécifiquement dans les MdMs, mais pas dans microglie, chez les souris Cx3cr1^{cre}P2x7^{lox} au cours de l'EAU. De façon intéressante, les souris déficientes pour les récepteurs C3aR1 et C5aR1 sont protégées contre l'EAU (Zhang et al., 2016) et l'expression de C3aR1 est augmentée dans les monocytes de patients atteints du syndrome VKH (Whang et al., 2017). De plus, une activation excessive de C3aR1 entraîne une phagocytose aberrante menant à une perte des terminaisons synaptiques et à des déficiences cognitives dans des modèles de la maladie d'Alzheimer et après une infection virale (Litvinchuk et al., 2018 ; Vasek et al., 2016). Ensemble, ces données suggèrent que l'effet protecteur observé après la délétion de P2X7 dans les MdMs serait dû en partie à la downrégulation de C3aR1 et C5aR1.

Nos résultats montrent aussi que la perte de l'expression de P2X7 dans les MPs conduit à une diminution de la fréquence des cellules Th17, celles-ci jouant un rôle important dans l'EAU (Luger et al., 2008). Cet effet indirect pourrait être dû à la diminution de l'expression des médiateurs de l'inflammation observée dans les MPs déficients pour P2X7, notamment l'IL-1 qui est nécessaire à la différenciation des Th17 dans l'EAE (Sutton et al., 2006 ; Chung et al., 2009). De même, les souris ayant des mutations gains de fonction dans le gène codant pour la protéine NLRP3 sont caractérisées par une augmentation de la production d'IL-1 β et une réponse immunitaire à dominante Th17 (Meng et al., 2009 ; Brydges et al., 2009). Ainsi, dans l'EAU, la surexpression des composants de la voie NLRP3 dans les MPs, induite par l'activation de P2X7 pourrait contribuer à la polarisation des cellules Th17. De plus, l'activation de C3aR sur les monocytes contribue à la polarisation en Th17 en augmentant la libération d'ATP favorisant ainsi l'activation de NLRP3 (Asgari et al., 2013). C5aR participe à la différenciation des Th17, lorsqu'il est activé sur les monocytes, comme cela a été montré dans l'arthrite et le lupus (Hashimoto et al., 2010 ; Pawaria et al., 2014). Nos résultats suggèrent donc que P2X7 contrôle de façon

indirecte la polarisation des lymphocytes T vers le phénotype Th17 et que son absence sur les MPs pourrait réduire la fréquence des cellules Th17 en diminuant l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 ainsi que l'expression de C3aR et C5aR sur les MPs.

Dans l'EAU, la microglie a des propriétés de cellules présentatrices de l'antigène (Lipski et al., 2017) et contribue au recrutement de cellules immunitaires (Okunuki et al., 2019). Afin d'analyser les changements transcriptionnels dépendants de P2X7 dans la microglie, nous nous sommes tournés vers les données de scRNAseq des MPs. Nous avons tout d'abord remarqué que le profil d'expression des microglies passait d'un état inactivé chez la souris naïve à un état pro-inflammatoire durant l'EAU, exprimant des marqueurs pro-inflammatoires comme *ApoE*, ce qui est consistant avec les données du modèle EAE (Krasemann et al., 2017). Nous avons observé que l'absence de P2X7 sur les MPs réduit la population de microglie sensible à l'IFN- γ (Friedman et al., 2018). Ces données suggèrent que cette population de microglie tend à être particulièrement pro-inflammatoire, elle pourrait donc prendre part au développement de l'EAU. Cependant, la réduction observée pourrait être liée à un effet indirect de l'absence de P2X7 sur les MdMs, conduisant à une diminution générale de la production de cytokines, en particulier l'IFN- γ et ne serait pas reliée directement à l'expression de P2X7 par la microglie. En utilisant le modèle de souris *Cx3cr1^{creER}P2x7^{lox}*, nous avons montré que la délétion de P2X7 spécifiquement dans la microglie diminue la sévérité de la maladie ce qui indique que l'activation de P2X7 sur la microglie favorise ses fonctions délétères.

En conclusion, notre analyse des fonctions de P2X7 selon la population cellulaire l'exprimant dans l'EAU montre que P2X7 joue un rôle pivot lorsqu'il est exprimé par les MPs, orchestrant les réponses innée et adaptative.

Perspectives thérapeutiques

Les corticostéroïdes sont utilisés principalement pour traiter les différentes formes d'uvéites (Jabs et al., 2000 ; Shome et al., 2021). L'administration peut être faite de manière topique (gouttes oculaires), locale (injection intravitréenne, périoculaire ou par implants oculaire) ou systémique (voie orale, intramusculaire ou intraveineuse) et celle-ci dépend de la localisation de l'inflammation (Taylor et al., 2010). Cependant, l'administration à long terme de corticostéroïdes peut avoir des effets secondaires handicapant comme le développement d'un glaucome ou d'une cataracte, une plus forte sensibilité aux infections ou une augmentation de la pression intraoculaire. De même, l'administration systémique de corticostéroïdes peut entraîner une augmentation de la pression sanguine, de l'ostéoporose ainsi que de la prise de poids (Jabs et al., 2000 ; Sadiq et al., 2015). Les anticorps monoclonaux anti-TNF α sont aussi utilisés pour traiter les uvéites, comme l'infliximab et l'adalimumab, et ont montré des effets significatifs chez des patients atteints de la maladie de Behçet (Markomichelakis et al., 2011). L'emploi

à long terme de ces anticorps pourrait cependant augmenter le risque de développer des infections ou favoriser la réactivation de pathogènes dormants (Antoni et al., 2002).

Le développement des connaissances sur la pathogénèse des uvéites ainsi que les effets secondaires associés à l'utilisation des corticostéroïdes ont poussé vers le développement de nouveaux traitements (Shome et al., 2021). Ces nouvelles thérapies tentent de bloquer certaines cytokines pro-inflammatoires, d'inhiber l'activation ou la migration des cellules T ou de favoriser la génération de Tregs. Chez les patients atteints de la maladie de Behçet et du syndrome de Blau, les anticorps humanisés ciblant l'IL-1 β (canakinumab, gevokizumab) ou le récepteur à l'IL-1 β (anakinra) ont été testés (Simonini et al., 2013 ; Cavalli et al., 2018 ; Gül et al., 2012). Des études cliniques ont montré que le sirolimus (rapamycine), ciblant la voie mTOR, était efficace dans le traitement des uvéites postérieures auto-immunes par voie orale ou intravitréenne (Agarwal et al., 2016). Cependant, l'hétérogénéité des uvéites, que ce soit leur forme ou leur origine, se présente comme un obstacle majeur (Lin et al., 2014). En effet, une thérapie qui fonctionne pour un type d'uvéite ne sera pas nécessairement effective pour un autre et dans le cas des uvéites associées à des maladies systémiques pourrait au contraire aggraver le phénotype de la pathologie. Il apparaît donc pertinent d'élargir la gamme des thérapies potentielles pour le traitement des uvéites non infectieuses.

L'inhibiteur de P2X7 le plus couramment utilisé est le Bleu Brillant G, celui-ci étant efficace chez l'homme, la souris, le rat et le cobaye et du fait de sa perméabilité à la barrière hémato-encéphalique. Plusieurs études ont montré l'efficacité du BBG dans des modèles de maladies neuro-inflammatoires et auto-immunes comme cela a été présenté précédemment (Chapitre 3 Partie 4). Dans le modèle EAU, le traitement de souris C57Bl6/J avec le BBG (50 mg/kg), injecté en intraveineuse, pendant 14 jours après immunisation diminue la sévérité de la maladie (Takeda et al., 2018). De même, l'inhibition de P2X7 avec l'oATP (300 μ g/souris, deux fois par semaine) entraîne une atténuation des symptômes cliniques (Zhao et al., 2016). Toutefois, dans ces études, le traitement était réalisé de façon systémique et il a été montré que ces inhibiteurs manquent de spécificité. En effet, le BBG n'est pas spécifique de P2X7 uniquement et inhibe aussi les récepteurs P2X1 et P2X4 (Young et al., 2018). Plusieurs antagonistes avec une plus forte spécificité ont par la suite été développés, notamment l'A438079 (Nelson et al., 2006), dérivé du tétrazole, et l'A740003 (Honore et al., 2006), dérivé de la cyanoguanidine. Plus récemment, des anticorps dérivés de camélidés ciblant spécifiquement P2X7 ont été développés (Koch-Nolte et al., 2019). Ces anticorps, appelés nanocorps, ne sont constitués que de la partie variable d'une chaîne lourde et bien qu'étant d'une plus petite taille (15 kDas), ceux-ci conservent ainsi la spécificité d'un anticorps conventionnel. Ils peuvent être administrés par injection systémique ou locale ou exprimés de façon continue grâce à des vecteurs viraux (adeno-associated viral vectors, AAV). Ces nanocorps peuvent être fusionnés à d'autres nanocorps afin de former des

nanocorps bispécifiques et de cibler un type cellulaire particulier par exemple. L'efficacité d'un nanocorps inhibiteur de P2X7 (13A7) a été confirmée chez la souris dans un modèle de glomérulonéphrite expérimentale ainsi que dans un modèle de dermatite allergique (Danquah et al., 2016). D'après les résultats de notre étude, il pourrait être envisagé de combiner un nanocorps anti-P2X7 à un nanocorps anti-CD11b afin d'inhiber le récepteur P2X7 exprimé par les MPs.

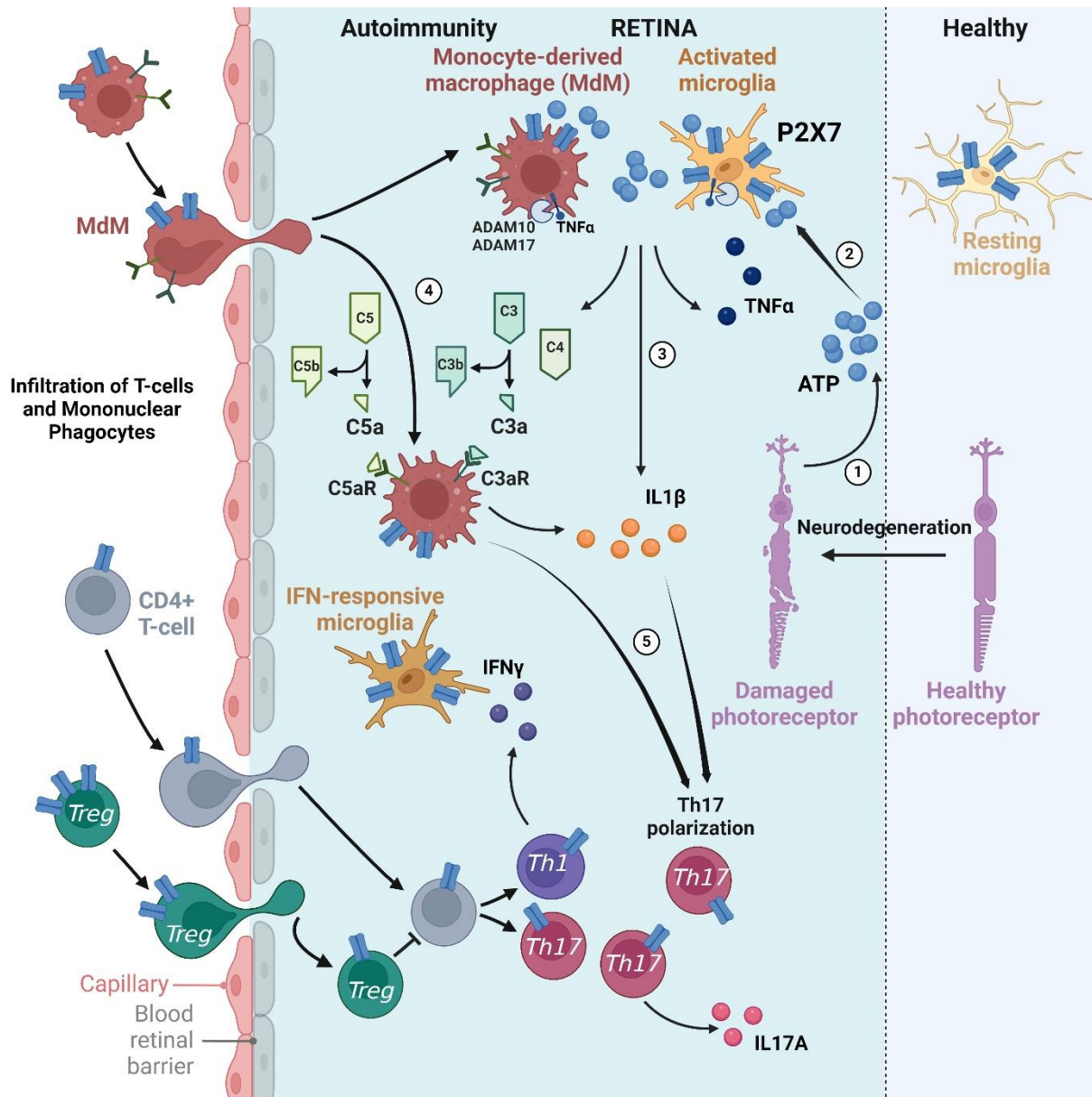


Figure 12 : Représentation schématique sur les rôles potentiels de P2X7 au cours de la réponse auto-immune dans la rétine. (1) Des lymphocytes T CD4+ autoréactifs, activés à la périphérie, infiltrent la rétine en traversant la barrière hémato-rétinienne. Ces lymphocytes reconnaissent leur antigène localement, activent la microglie rétinienne et induisent le recrutement de monocytes depuis la périphérie. L'inflammation entraîne la dégénérescence et la mort des cellules photoréceptrices qui libèrent leur contenu intracellulaire ce qui fait augmenter la concentration

extracellulaire d'ATP. (2) Les fortes concentrations d'ATP extracellulaire activent le récepteur P2X7 exprimés par la microglie et les macrophages ce qui induit : le clivage du TNF- α membranaire par les métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 et sa libération, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion de l'IL-1 β (3) et la libération des molécules du complément C3, C4 et C5 par les macrophages. C3 et C5 sont ensuite clivées en C3a et C3b et C5a et C5b. Ces molécules en retour activent les récepteurs C3aR et C5aR à la surface des macrophages (4). (5) L'action conjointe de l'IL-1 β et du complément favorise la polarisation des lymphocytes T CD4+ en Th17

BIBLIOGRAPHIE

Abbracchio, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281–341 (2006).

Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications. (Springer International Publishing, Cham, 2016). doi:10.1007/978-3-319-47691-9.

Adinolfi, E. et al. Accelerated Tumor Progression in Mice Lacking the ATP Receptor P2X7. *Cancer Research* 75, 635–644 (2015).

Agarwal, A. et al. Sirolimus for Retinal and Uveitic Diseases. in *Developments in Ophthalmology* (eds. Nguyen, Q. D., Rodrigues, E. B., Farah, M. E., Mieler, W. F. & Do, D. V.) vol. 55 276–281 (S. Karger AG, 2016).

Agarwal, R. K. & Caspi, R. R. Rodent Models of Experimental Autoimmune Uveitis.

Agarwal, R. K., Silver, P. B. & Caspi, R. R. Rodent Models of Experimental Autoimmune Uveitis. in *Autoimmunity* (ed. Perl, A.) vol. 900 443–469 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).

Amadi-Obi, A. et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13, 711–718 (2007).

Amadio, S. et al. Modulation of P2X7 Receptor during Inflammation in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 8, 1529 (2017).

Amstrup, J. & Novak, I. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochemical Journal* 374, 51–61 (2003).

Anderson, M. S. et al. Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395–1401 (2002).

Antoni, C. & Braun, J. Side effects of anti-TNF therapy: Current knowledge.

Apte, R. S., Sinha, D., Mayhew, E., Wistow, G. J. & Niederkorn, J. Y. Cutting Edge: Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Inhibiting NK Cell Activity and Preserving Immune Privilege. *The Journal of Immunology* 160, 5693–5696 (1998).

Arbonés, M. L. et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1, 247–260 (1994).

ARONSON, S. B., HOGAN, M. J. & ZWEIGART, P. Homoimmune Uveitis in the Guinea Pig: I. General Concepts of Auto- and Homoimmunity, Methods, and Manifestations. *Archives of Ophthalmology* 69, 105–109 (1963).

Asgari, E. et al. C3a modulates IL-1 β secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* 122, 3473–3481 (2013).

Aswad, F., Kawamura, H. & Dennert, G. High Sensitivity of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells to Extracellular Metabolites Nicotinamide Adenine Dinucleotide and ATP: A Role for P2X7 Receptors. *The Journal of Immunology* 175, 3075–3083 (2005).

Atarashi, K. et al. ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808–812 (2008).

Avichezer, D. et al. An Immunologically Privileged Retinal Antigen Elicits Tolerance. *The Journal of Experimental Medicine* 198, 1665–1676 (2003).

Avichezer, D., Silver, P. B., Chan, C.-C., Wiggert, B. & Caspi, R. R. Identification of a New Epitope of Human IRBP that Induces Autoimmune Uveoretinitis in Mice of the H-2b Haplotype. 41, (2000).

Barberà-Cremades, M. et al. P2X7 Receptor Induces Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme Activation and Release to Boost TNF- α Production. *Front. Immunol.* 8, 862 (2017).

Barnes, S., Grove, J. C. R., McHugh, C. F., Hirano, A. A. & Brecha, N. C. Horizontal Cell Feedback to Cone Photoreceptors in Mammalian Retina: Novel Insights From the GABA-pH Hybrid Model. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 595064 (2020).

Bazan, J. F. et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 640–644 (1997).

Behar-Cohen, F., Gelizé, E., Jonet, L. & Lassiaz, P. Anatomie de la rétine. *Med Sci (Paris)* 36, 594–599 (2020).

Belikoff, B. G. et al. A2B Adenosine Receptor Blockade Enhances Macrophage-Mediated Bacterial Phagocytosis and Improves Polymicrobial Sepsis Survival in Mice. *The Journal of Immunology* 186, 2444–2453 (2011).

Bora, N. S. & Kaplan, H. J. Differential Expression of the Complement Regulatory Proteins in the Human Eye.

Brydges, S. D. et al. Inflammasome-Mediated Disease Animal Models Reveal Roles for Innate but Not Adaptive Immunity. *Immunity* 30, 875–887 (2009).

Burkholder, B. M. & Jabs, D. A. Uveitis for the non-ophthalmologist. *BMJ* m4979 (2021) doi:10.1136/bmj.m4979. Burkholder, B. M. Vogt–Koyanagi–Harada disease: Current Opinion in Ophthalmology 26, 506–511 (2015).

Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1471–1483 (2007).

Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. & Smythe, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British J Pharmacology* 40, 668–688 (1970).

Burnstock, G. & Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology: The Vascular System* 16, 433–440 (1985).

Burnstock, G. & Knight, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. in *International Review of Cytology* vol. 240 31–304 (Elsevier, 2004).

Calder, V. L., Zhao, Z. S., Wang, Y. & Barton, K. Effects of CD8 depletion on retinal soluble antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis.

- Cardona, A. E. et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9, 917–924 (2006).
- Carmo, M. R. S. et al. 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, 142–152 (2014).
- Carvalho, K. et al. P2X7-deficiency improves plasticity and cognitive abilities in a mouse model of Tauopathy. *Progress in Neurobiology* 206, 102139 (2021).
- Caspi, R. R. et al. Endogenous systemic IFN-gamma has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *The Journal of Immunology* 152, 890–899 (1994).
- Caspi, R. R., Grubbs, B. G., Chan, C. C., Chader, G. J. & Wiggert, B. Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. Concomitant regulation by MHC and non-MHC genes. *The Journal of Immunology* 148, 2384–2389 (1992).
- Caspi, R. R. et al. Genetic factors in susceptibility and resistance to experimental autoimmune uveoretinitis. *Current Eye Research* 11, 81–86 (1992).
- Caspi, R. R. Experimental Autoimmune Uveoretinitis in the Rat and Mouse. *CP in Immunology* 53, (2003).
- Caspi, R. R. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunological Reviews* 213, 23–35 (2006).
- Caspi, R. R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J. Clin. Invest.* 120, 3073–3083 (2010).
- Cavalli, G. & Dinarello, C. A. Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases. *Front. Pharmacol.* 9, 1157 (2018).
- Chaumont, S., Jiang, L.-H., Penna, A., North, R. A. & Rassendren, F. Identification of a Trafficking Motif Involved in the Stabilization and Polarization of P2X Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279, 29628–29638 (2004).
- Chen, L. & Brosnan, C. F. Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in P2X 7R $-/-$ Mice: Evidence for Loss of Apoptotic Activity in Lymphocytes. *J Immunol* 176, 3115–3126 (2006).
- Chen, L. et al. Diminished Frequency and Function of CD4 + CD25 high Regulatory T Cells Associated with Active Uveitis in Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3475 (2008).
- Chessell, I. P. et al. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114, 386–396 (2005).
- Chi, W. et al. IL-23 promotes CD4+ T cells to produce IL-17 in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, 1218–1224 (2007).

- Chi, W. et al. Upregulated IL-23 and IL-17 in Behçet Patients with Active Uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3058 (2008).
- Chung, Y. et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by IL-1 signaling (48.24). *The Journal of Immunology* 182, 48.24-48.24 (2009).
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K. & Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British J Pharmacology* 164, 1079–1106 (2011).
- Costa-Junior, H. M., Sarmiento Vieira, F. & Coutinho-Silva, R. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signalling* 7, 7–19 (2011).
- Cousins, S. W. Identification of Transforming Growth Factor-Beta as an Immunosuppressive Factor in Aqueous Humor.
- Couturier, A. et al. Anti-vascular endothelial growth factor acts on retinal microglia/macrophage activation in a rat model of ocular inflammation. *Molecular Vision* (2014).
- Danquah, W. et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci. Transl. Med.* 8, (2016).
- De Smet, M. D., Dayan, M. & Nussenblatt, R. B. A novel method for the determination of T-cell proliferative responses in patients with uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation* 6, 173–178 (1998).
- De Torre-Minguela, C., Barberà-Cremades, M., Gómez, A. I., Martín-Sánchez, F. & Pelegrín, P. Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. *Sci Rep* 6, 22586 (2016).
- Deaglio, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1257–1265 (2007).
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. & Kanellopoulos, J. M. The Purinergic Receptor P2X7 Triggers α -Secretase-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *Journal of Biological Chemistry* 286, 2596–2606 (2011).
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. & Kanellopoulos, J. M. The Purinergic Receptor P2X7 Triggers α -Secretase-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *Journal of Biological Chemistry* 286, 2596–2606 (2011).
- Denlinger, L. C. et al. Cutting Edge: The Nucleotide Receptor P2X7 Contains Multiple Protein and Lipid-Interaction Motifs Including a Potential Binding Site for Bacterial Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* 167, 1871–1876 (2001).
- Deschenes, J., Murray, P. I., Rao, N. A. & Nussenblatt, R. B. International Uveitis Study Group (IUSG) Clinical Classification of Uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation* 16, 1–2 (2008).
- DeVoss, J. et al. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single selfantigen. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2727–2735 (2006).

- Di Lauro, C. et al. P2X7 receptor blockade reduces tau induced toxicity, therapeutic implications in tauopathies. *Progress in Neurobiology* 208, 102173 (2022).
- Di Virgilio, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. *Trends in Pharmacological Sciences* 28, 465–472 (2007).
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31 (2017).
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31 (2017).
- Diaz-Hernandez, J. I. et al. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiology of Aging* 33, 1816–1828 (2012).
- Ding, S., Kumar, S. & Mok, P. Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *IJMS* 18, 1406 (2017).
- Dixon, M. A., Greferath, U., Fletcher, E. L. & Jobling, A. I. The Contribution of Microglia to the Development and Maturation of the Visual System. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 659843 (2021).
- Durrenberger, Pascal. F. et al. Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease; A BNE Microarray Study. *Parkinson's Disease* 2012, 1–16 (2012).
- Eandi, C. M. et al. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *eLife* 5, e16490 (2016).
- Ferrari, D. et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. 9.
- Ferrari, D. et al. The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *The Journal of Immunology* 176, 3877–3883 (2006).
- Ferrazoli, E. G. et al. Brilliant Blue G, but not Fenofibrate, Treatment Reverts Hemiparkinsonian Behavior and Restores Dopamine Levels in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant* 26, 669–677 (2017).
- Forrester, J. V., Xu, H., Lambe, T. & Cornall, R. Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunology* 1, 372–381 (2008).
- Forrester, J. V., Klaska, I. P., Yu, T. & Kuffova, L. Uveitis in Mouse and Man. *International Reviews of Immunology* 32, 76–96 (2013).
- Forrester, J. V., Kuffova, L. & Dick, A. D. Autoimmunity, Autoinflammation, and Infection in Uveitis. *American Journal of Ophthalmology* 189, 77–85 (2018).
- Franke, K. & Baden, T. General features of inhibition in the inner retina. *The Journal of Physiology* 595, 5507–5515 (2017).
- Fu Y. Phototransduction in Rods and Cones. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; April 1, 2010.

Fujimoto, C. et al. Pertussis Toxin Is Superior to TLR Ligands in Enhancing Pathogenic Autoimmunity, Targeted at a Neo-Self Antigen, by Triggering Robust Expansion of Th1 Cells and Their Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 177, 6896–6903 (2006).

Funakoshi, H. et al. Regulated Overexpression of the A₁-Adenosine Receptor in Mice Results in Adverse but Reversible Changes in Cardiac Morphology and Function. *Circulation* 114, 2240–2250 (2006).

Galkina, E. et al. L-Selectin Shedding Does Not Regulate Constitutive T Cell Trafficking but Controls the Migration Pathways of Antigen-activated T Lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 198, 1323–1335 (2003).

Garbers, C. et al. 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, 14804–14811 (2011).

Gery, I. & Caspi, R. R. Tolerance Induction in Relation to the Eye. *Front. Immunol.* 9, 2304 (2018).

Ghiringhelli, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15, 1170–1178 (2009).

Ginhoux, F. et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845 (2010).

Giuliani, A. L., Sarti, A. C., Falzoni, S. & Di Virgilio, F. The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Front. Pharmacol.* 8, (2017).

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995 ;270(5239) :1189-1192.doi :10.1126/science.270.5239.1189

Gordon, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal* 233, 309–319 (1986).

Gotter, J., Brors, B., Hergenbahn, M. & Kyewski, B. Medullary Epithelial Cells of the Human Thymus Express a Highly Diverse Selection of Tissue-specific Genes Colocalized in Chromosomal Clusters. *The Journal of Experimental Medicine* 199, 155–166 (2004).

Gregerson, D. S. et al. Retinal Expression of a Neo-Self Antigen, β -Galactosidase, Is Not Tolerogenic and Creates a Target for Autoimmune Uveoretinitis. *The Journal of Immunology* 163, 1073–1080 (1999).

Gregory, M. S. et al. Membrane Fas Ligand Activates Innate Immunity and Terminates Ocular Immune Privilege. *The Journal of Immunology* 169, 2727–2735 (2002).

Grygorowicz, T. & Strużyńska, L. Early P2X7R-dependent activation of microglia during the asymptomatic phase of autoimmune encephalomyelitis. *Inflammopharmacol* 27, 129–137 (2019).

- Grygorowicz, T., Wełniak-Kamińska, M. & Strużyńska, L. Early P2X7R-related astrogliosis in autoimmune encephalomyelitis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 74, 1–9 (2016).
- Gu, B., Bendall, L. J. & Wiley, J. S. Adenosine Triphosphate–Induced Shedding of CD23 and L-Selectin (CD62L) From Lymphocytes Is Mediated by the Same Receptor but Different Metalloproteases. *Blood* 92, 946–951 (1998).
- Gu, B. J. & Wiley, J. S. P2X7 as a scavenger receptor for innate phagocytosis in the brain: Phagocytic role of P2X7 receptor. *British Journal of Pharmacology* 175, 4195–4208 (2018).
- Gu, B. J. et al. 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 j.* 27, 1479–1487 (2013).
- Gu, B. J. et al. 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. *Journal of Biological Chemistry* 287, 17318–17330 (2012).
- Gu, B. J., Rathsam, C., Stokes, L., McGeachie, A. B. & Wiley, J. S. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X 7 complex: this dissociation regulates P2X 7 pore formation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 297, C430–C439 (2009).
- Gu, B. J., Saunders, B. M., Jursik, C. & Wiley, J. S. The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsonized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP. *Blood* 115, 1621–1631 (2010).
- Gu, B. J., Saunders, B. M., Petrou, S. & Wiley, J. S. P2X7 Is a Scavenger Receptor for Apoptotic Cells in the Absence of Its Ligand, Extracellular ATP. *The Journal of Immunology* 187, 2365–2375 (2011).
- Gül, A. et al. Interleukin-1 β -regulating antibody XOMA 052 (gevokizumab) in the treatment of acute exacerbations of resistant uveitis of Behçet’s disease: an open-label pilot study. *Ann Rheum Dis* 71, 563–566 (2012).
- Haag, F. et al. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling* 3, 71 (2007).
- Habbas, S., Ango, F., Daniel, H. & Galante, M. Purinergic signaling in the cerebellum: Bergmann glial cells express functional ionotropic P2X 7 receptors. *Glia* 59, 1800–1812 (2011).
- Haddad, M., Cherchi, F., Alsalem, M., Al-saraireh, Y. M. & Madae’en, S. Adenosine Receptors as Potential Therapeutic Analgesic Targets. *IJMS* 24, 13160 (2023).
- Hara, Y. et al. Suppression of experimental autoimmune uveitis in mice by induction of anterior chamber-associated immune deviation with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *The Journal of Immunology* 148, 1685–1692 (1992).

Hashimoto, M. et al. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 207, 1135–1143 (2010).

Hattori, M. & Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207–212 (2012).

He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B. & Núñez, G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530, 354–357 (2016).

Heneka, M. T. et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678 (2013).

Hirose, S. et al. Regulation of experimental autoimmune uveitis in rats—separation of MHC and non-MHC gene effects. *Clinical and Experimental Immunology* 86, 419–425 (2008).

Honore, P. et al. A-740003 [N-(1-[[[(Cianoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a Novel and Selective P2X₇ Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1376–1385 (2006).

Horai, R. & Caspi, R. R. Cytokines in Autoimmune Uveitis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31, 733–744 (2011).

Horai, R. & Caspi, R. R. Microbiome and Autoimmune Uveitis. *Front. Immunol.* 10, 232 (2019).

Horai, R. et al. Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *Journal of Autoimmunity* 44, 21–33 (2013).

Horai, R. et al. Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site. *Immunity* 43, 343–353 (2015).

Hu, S. J. et al. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1 -Deficient Mononuclear Phagocytes Leads to Increased Interleukin-1 β Secretion and Photoreceptor Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 35, 6987–6996 (2015).

Huang, Y. et al. Dual extra-retinal origins of microglia in the model of retinal microglia repopulation. *Cell Discov* 4, 9 (2018).

Huang, Y. et al. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat Neurosci* 21, 530–540 (2018).

Hubert, S. et al. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2–P2X₇ pathway. *Journal of Experimental Medicine* 207, 2561–2568 (2010).

Illes, P., Khan, T. M. & Rubini, P. Neuronal P2X₇ Receptors Revisited: Do They Really Exist? *J. Neurosci.* 37, 7049–7062 (2017).

Illes, P., Verkhatsky, A., Burnstock, G. & Franke, H. P2X Receptors and Their Roles in Astroglia in the Central and Peripheral Nervous System. *Neuroscientist* 18, 422–438 (2012).

Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z. & Streilein, J. W. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocular Immunology and Inflammation* 11, 91–105 (2003).

Jabs, D. A. et al. Guidelines for the Use of Immunosuppressive Drugs in Patients With Ocular Inflammatory Disorders: Recommendations of an Expert Panel. *AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY* 130, (2000).

Janks, L., Sharma, C. V. R. & Egan, T. M. A central role for P2X7 receptors in human microglia. *J Neuroinflammation* 15, 325 (2018).

Jardel, P. et al. Tumeurs malignes ophtalmologiques : indications de la radiothérapie et techniques. *Cancer/Radiothérapie* 19, 762–774 (2015).

Jarvis, M. F. & Khakh, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56, 208–215 (2009).

Jiang, L.-H., Baldwin, J. M., Roger, S. & Baldwin, S. A. Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Front. Pharmacol.* 4, (2013).

Jiang, L.-H., Caseley, E. A., Muench, S. P. & Roger, S. Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP. *Purinergic Signalling* 17, 331–344 (2021).

Jiang, L.-H. et al. Subunit Arrangement in P2X Receptors. *J. Neurosci.* 23, 8903–8910 (2003).

Jiang, T. et al. P2X7 receptor is critical in α -synuclein-mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiology of Aging* 36, 2304–2318 (2015).

Johansson, B. et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9407–9412 (2001).

Kaczmarek-Hajek, K. et al. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *eLife* 7, e36217 (2018).

Kanellopoulos, J. M. & Delarasse, C. Pleiotropic Roles of P2X7 in the Central Nervous System. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 401 (2019).

Karasawa, A. & Kawate, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* 5, e22153 (2016).

Karlstetter, M. et al. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research* 45, 30–57 (2015).

Ke, Y., Jiang, G., Sun, D., Kaplan, H. J. & Shao, H. Ocular Regulatory T Cells Distinguish Monophasic from Recurrent Autoimmune Uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3999 (2008).

- Kennedy, M. C. et al. Novel production of interleukin-1 receptor antagonist peptides in normal human cornea. *J. Clin. Invest.* 95, 82–88 (1995).
- Kerur, N. et al. TLR-Independent and P2X7-Dependent Signaling Mediate Alu RNA-Induced NLRP3 Inflammasome Activation in Geographic Atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 7395 (2013).
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of Microglia. *Physiological Reviews* 91, 461–553 (2011).
- Koch-Nolte, F. et al. Novel biologics targeting the P2X7 ion channel. *Current Opinion in Pharmacology* 47, 110–118 (2019).
- Kolb H. Glial Cells of the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2001.
- Kolb H. Photoreceptors. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 1, 2005.
- Koprach, J. B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P. & Isacson, O. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 5, 8 (2008).
- Kozak, Y. de, Sakai, J., Thillaye, B. & Faure, J. P. S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Current Eye Research* 1, 327–337 (1981).
- Krasemann, S. et al. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47, 566-581.e9 (2017).
- Ksiaz, I. et al. Œil et maladie de Behçet. *Journal Français d'Ophtalmologie* 42, 626–641 (2019).
- Kulkarni, P. Review: Uveitis and Immunosuppressive Drugs. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 17, 181–187 (2001).
- Lambe, T. et al. Limited Peripheral T Cell Anergy Predisposes to Retinal Autoimmunity. *The Journal of Immunology* 178, 4276–4283 (2007).
- Lebouvier, T., Pasquier, F. & Buée, L. Update on tauopathies. *Current Opinion in Neurology* 30, 589–598 (2017).
- Lee, H. G., Won, S. M., Gwag, B. J. & Lee, Y. B. Microglial P2X 7 receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP swe /PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Mol Med* 43, 7 (2011).
- Li, F., Jiang, D. & Samuel, M. A. Microglia in the developing retina. *Neural Dev* 14, 12 (2019).
- Liang, K. J. et al. Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4444 (2009).

- Lin, P., Suhler, E. B. & Rosenbaum, J. T. The Future of Uveitis Treatment. *Ophthalmology* 121, 365–376 (2014).
- Lipski, D. A. et al. MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation* 14, 136 (2017).
- Litvinchuk, A. et al. Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron* 100, 1337-1353.e5 (2018).
- Luger, D. & Caspi, R. R. New perspectives on effector mechanisms in uveitis. *Semin Immunopathol* 30, 135–143 (2008).
- Luger, D. et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 799–810 (2008).
- Mansoor, S. E. et al. X-ray structures define human P2X3 receptor gating cycle and antagonist action. *Nature* 538, 66–71 (2016).
- Margo, C. E. & Harman, L. E. Autoimmune disease: Conceptual history and contributions of ocular immunology. *Survey of Ophthalmology* 61, 680–688 (2016).
- Markomichelakis, N. et al. A single infliximab infusion vs corticosteroids for acute panuveitis attacks in Behcet's disease: a comparative 4-week study. *Rheumatology* 50, 593–597 (2011).
- Martin, E. et al. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol Psychiatry* 24, 108–125 (2019).
- Martínez-Cuesta, M. Á., Blanch-Ruiz, M. A., Ortega-Luna, R., Sánchez-López, A. & Álvarez, Á. Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor. *IJMS* 21, 8454 (2020).
- Mattapallil, M. J. et al. Characterization of a New Epitope of IRBP That Induces Moderate to Severe Uveoretinitis in Mice With H-2 b Haplotype. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 5439 (2015).
- Matute, C. et al. P2X7 Receptor Blockade Prevents ATP Excitotoxicity in Oligodendrocytes and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience* 27, 9525–9533 (2007).
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E. & McGeer, E. G. Reactive microglia are positive for HLADR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285–1285 (1988).
- McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G. & Choi, H. B. Upregulated Expression of Purinergic P2X7 Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid-A Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 8 (2006).

- McPherson, S. W., Heuss, N. D., Pierson, M. J. & Gregerson, D. S. Retinal antigen-specific regulatory T cells protect against spontaneous and induced autoimmunity and require local dendritic cells. *J Neuroinflammation* 11, 205 (2014).
- Medawar, P. B. IMMUNITY TO HOMOLOGOUS GRAFTED SKIN. III. THE FATE OF SKIN HOMOGRAFTS TRANSPLANTED TO THE BRAIN, TO SUBCUTANEOUS TISSUE, AND TO THE ANTERIOR CHAMBER OF THE EYE.
- Meng, G., Zhang, F., Fuss, I., Kitani, A. & Strober, W. A Mutation in the Nlrp3 Gene Causing Inflammasome Hyperactivation Potentiates Th17 Cell-Dominant Immune Responses. *Immunity* 30, 860–874 (2009).
- Metzger, M. W. et al. Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. *Purinergic Signalling* 13, 153–170 (2017).
- Miras-Portugal, M. T., Sebastián-Serrano, Á., de Diego García, L. & Díaz-Hernández, M. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *J. Neurosci.* 37, 7063–7072 (2017).
- Muñoz-Planillo, R. et al. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 38, 1142–1153 (2013).
- Murenu, E., Gerhardt, M.-J., Biel, M. & Michalakakis, S. More than meets the eye: The role of microglia in healthy and diseased retina. *Front. Immunol.* 13, 1006897 (2022).
- Namba K, Kitaichi N, Nishida T, Taylor AW. Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2. *J Leukoc Biol.* 2002;72(5):946-952
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S. C. & Brosnan, C. F. The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49, 245–258 (2005).
- Nelson R, Connaughton V. Bipolar Cell Pathways in the Vertebrate Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; May 24, 2007.
- Nelson, D. W. et al. Structure–Activity Relationship Studies on a Series of Novel, Substituted 1-Benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 Antagonists. *J. Med. Chem.* 49, 3659–3666 (2006).
- Newman, E. A. Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat. *Glia* 26, 302–308 (1999).
- Niederhorn, J. Y. Mechanisms of Immune Privilege in the Eye and Hair Follicle. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 8, 168–172 (2003).
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. 308, (2005).

Niu, X.-D. et al. ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor. *Molecular Biology of the Cell* 20, (2009).

North, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews* 82, 1013–1067 (2002).

Nussenblatt, R. B. et al. Treatment of noninfectious intermediate and posterior uveitis with the humanized anti-Tac mAb: A phase I/II clinical trial. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7462–7466 (1999).

O’Leary, F. & Campbell, M. The blood–retina barrier in health and disease. *The FEBS Journal* 290, 878–891 (2023).

Okunuki, Y. et al. Retinal microglia initiate neuroinflammation in ocular autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 9989–9998 (2019).

Oliveira-Giacomelli, Á. et al. P2Y6 and P2X7 Receptor Antagonism Exerts Neuroprotective/ Neuroregenerative Effects in an Animal Model of Parkinson’s Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 476 (2019).

Parvathenani, L. K. et al. P2X7 Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Upregulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13309–13317 (2003).

Pawaria, S. et al. Complement Component C5a Permits the Coexistence of Pathogenic Th17 Cells and Type I IFN in Lupus. *The Journal of Immunology* 193, 3288–3295 (2014).

Purinergic Signaling: Methods and Protocols. vol. 2041 (Springer New York, New York, NY, 2020).

Peng, Y. et al. Characterization of IL-17 + Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein Specific T Cells in Experimental Autoimmune Uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4153 (2007).

Perez, V. L. & Caspi, R. R. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease. *Trends in Immunology* 36, 354–363 (2015).

Perregaux, D. & Gabel, C. A. 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. *Journal of Biological Chemistry* 269, 15195–15203 (1994).

Perregaux, D. G., McNiff, P., Laliberte, R., Conklyn, M. & Gabel, C. A. ATP Acts as an Agonist to Promote Stimulus-Induced Secretion of IL-1 β and IL-18 in Human Blood. *The Journal of Immunology* 165, 4615–4623 (2000).

Rampe, D., Wang, L. & Ringheim, G. E. P2X7 receptor modulation of β -amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *Journal of Neuroimmunology* 147, 56–61 (2004).

- Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253–262 (2010).
- Reichenbach, A. & Bringmann, A. New functions of Müller cells. *Glia* 61, 651–678 (2013).
- Reichenbach, A. & Bringmann, A. Glia of the human retina. *Glia* 68, 768–796 (2020).
- Rissiek, B., Haag, F., Boyer, O., Koch-Nolte, F. & Adriouch, S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front. Immunol.* 6, (2015).
- Rose, N. R. & Bona, C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today* 14, 426–430 (1993).
- Rosenbaum, J. T., McDevitt, H. O., Guss, R. B. & Egbert, P. R. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 286, 611–613 (1980).
- Roubeix, C., Sahel, J.-A., Guillonneau, X., Delarasse, C. & Sennlaub, F. Sur les origines inflammatoires de la DMLA. *Med Sci (Paris)* 36, 886–892 (2020).
- Ruan, Z. et al. P2RX7 inhibitor suppresses exosome secretion and disease phenotype in P301S tau transgenic mice. *Mol Neurodegeneration* 15, 47 (2020).
- Safya, H. et al. Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage. *Front. Immunol.* 9, 360 (2018).
- Salesse, C. Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel. *Journal Français d'Ophtalmologie* 40, 239–250 (2017).
- Santos, A. M. et al. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J of Comparative Neurology* 506, 224–239 (2008).
- Sanz, J. M. et al. Activation of Microglia by Amyloid β Requires P2X 7 Receptor Expression. *J Immunol* 182, 4378–4385 (2009).
- Schenk, U. et al. ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors. *Sci. Signal.* 4, (2011).
- Schenk, U. et al. Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released Through Pannexin-1 Hemichannels. *Sci. Signal.* 1, (2008).
- Schmid-Burgk, J. L. et al. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Biological Chemistry* 291, 103–109 (2016).
- Seman, M. et al. NAD-Induced T Cell Death: ADP-Ribosylation of Cell Surface Proteins by ART2 Activates the Cytolytic P2X7 Purinoceptor.
- Sharp, A. J. et al. P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 5, 33 (2008).

Sheibani, N., Sorenson, C. M., Cornelius, L. A. & Frazier, W. A. Thrombospondin-1, a Natural Inhibitor of Angiogenesis, Is Present in Vitreous and Aqueous Humor and Is Modulated by Hyperglycemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267, 257–261 (2000).

Shome, A., Mugisho, O. O., Niederer, R. L. & Rupenthal, I. D. Blocking the inflammasome: A novel approach to treat uveitis. *Drug Discovery Today* 26, 2839–2857 (2021).

Silver, P. B., Chan, C.-C., Wiggert, B. & Caspi, R. R. The Requirement for Pertussis to Induce EAU Is Strain-Dependent: B10.RIII, but Not B10.A Mice, Develop EAU and Th1 Responses to IRBP without Pertussis Treatment. 40, (1999).

Silver, P. B. et al. Identification of a Major Pathogenic Epitope in the Human IRBP Molecule Recognized by Mice of the H-2r Haplotype. *binding protein*.

Silver, P. et al. Retina-Specific T Regulatory Cells Bring About Resolution and Maintain Remission of Autoimmune Uveitis. *The Journal of Immunology* 194, 3011–3019 (2015).

Simonini, G. et al. Clinical and transcriptional response to the long-acting interleukin-1 blocker canakinumab in Blau syndrome–related uveitis. *Arthritis & Rheumatism* 65, 513–518 (2013).

Sohn, J.-H., Kaplan, H. J., Suk, H.-J., Bora, P. S. & Bora, N. S. Chronic Low Level Complement Activation within the Eye Is Controlled by Intraocular Complement Regulatory Proteins. (2007).

Sohn, J.-H., Kaplan, H. J., Suk, H.-J. & Bora, P. S. Complement Regulatory Activity of Normal Human Intraocular Fluid Is Mediated by MCP, DAF, and CD59. (2007).

Solle, M. et al. Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 276, 125–132 (2001).

Steinberg, T. H., Newman, A. S., Swanson, J. A. & Silverstein, S. C. ATP₄- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *Journal of Biological Chemistry* 262, 8884–8888 (1987).

Streilein, J. W. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 74, 179–185 (2003).

Streilein, J. W. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3, 879–889 (2003).

Stuart, P. M. et al. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J. Clin. Invest.* 99, 396–402 (1997).

Sugita, S. Soluble Fas ligand and soluble Fas in ocular fluid of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology* 84, 1130–1134 (2000).

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. & Buell, G. The Cytolytic P₂X₇ Receptor for Extracellular ATP Identified as a P₂X₇ Receptor (P2X₇). *Science, New Series* 272, 735–738 (1996).

Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 1685–1691 (2006).

Takase, H. et al. Thymic expression of peripheral tissue antigens in humans: a remarkable variability among individuals. *International Immunology* 17, 1131–1140 (2005).

Takeda, A. et al. Crucial role of P2X7 receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis. *Jpn J Ophthalmol* 62, 398–406 (2018).

Tang, J. et al. Autoimmune Uveitis Elicited with Antigen-Pulsed Dendritic Cells Has a Distinct Clinical Signature and Is Driven by Unique Effector Mechanisms: Initial Encounter with Autoantigen Defines Disease Phenotype. *The Journal of Immunology* 178, 5578–5587 (2007).

Tarrant, T. K. et al. Interleukin 12 Protects from a T Helper Type 1-mediated Autoimmune Disease, Experimental Autoimmune Uveitis, through a Mechanism Involving Interferon γ , Nitric Oxide, and Apoptosis.

Taylor, A. W., Streilein, J. W. & Cousins, S. W. Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. *The Journal of Immunology* 153, 1080–1086 (1994).

Taylor, A. W. & Yee, D. G. Suppression of Nitric Oxide Generated by Inflammatory Microphages by Calcitonin Gene-Related Peptide in Aqueous Humor. 39, (1998).

Taylor, A. W., Streilein, J. W. & Cousins, S. W. Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor. *Current Eye Research* 11, 1199–1206 (1992).

Taylor, S. R. J., Isa, H., Joshi, L. & Lightman, S. New Developments in Corticosteroid Therapy for Uveitis. *Ophthalmologica* 224, 46–53 (2010).

Tomkins-Netzer, O. et al. Mechanisms of blood-retinal barrier disruption related to intraocular inflammation and malignancy. *Progress in Retinal and Eye Research* 99, 101245 (2024).

Tsirouki, T. et al. A Focus on the Epidemiology of Uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation* 26, 2–16 (2018).

Vasek, M. J. et al. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* 534, 538–543 (2016).

Vergani, A. et al. Effect of the Purinergic Inhibitor Oxidized ATP in a Model of Islet Allograft Rejection. *Diabetes* 62, 1665–1675 (2013).

Vergani, A. et al. Long-Term Heart Transplant Survival by Targeting the Ionotropic Purinergic Receptor P2X7. *Circulation* 127, 463–475 (2013).

Vessey, K. A. et al. Loss of Function of P2X7 Receptor Scavenger Activity in Aging Mice. *The American Journal of Pathology* 187, 1670–1685 (2017).

- Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523–532 (2008).
- Vultaggio-Poma, V., Falzoni, S., Salvi, G., Giuliani, A. L. & Di Virgilio, F. Signalling by extracellular nucleotides in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1869, 119237 (2022).
- Wacker, W. B. & Kalsow, C. M. Autoimmune Uveo-Retinitis in the Rat Sensitized with Retina Photoreceptor Cell Antigen. *Int Arch Allergy Immunol* 45, 582–592 (1973).
- Wang, C. et al. Increased Complement 3a Receptor is Associated with Behcet's disease and VogtKoyanagi-Harada disease. *Sci Rep* 7, 15579 (2017).
- Wang, X.-H., Xie, X., Luo, X.-G., Shang, H. & He, Z.-Y. Inhibiting purinergic P2X7 receptors with the antagonist brilliant blue G is neuroprotective in an intranigral lipopolysaccharide animal model of Parkinson's disease. *Molecular Medicine Reports* 15, 768–776 (2017).
- Wildner, G. Antigenic mimicry – The key to autoimmunity in immune privileged organs. *Journal of Autoimmunity* 137, 102942 (2023).
- Wildner, G. & Diedrichs-Möhring, M. Autoimmune uveitis and antigenic mimicry of environmental antigens. *Autoimmunity Reviews* 3, 383–387 (2004).
- Wilhelm, K. et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16, 1434–1438 (2010).
- Xu, H. et al. A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Experimental Eye Research* 87, 319–326 (2008).
- Xu, H., Rizzo, L. V., Silver, P. B. & Caspi, R. R. Uveitogenicity Is Associated with a Th1-like Lymphokine Profile: Cytokine-Dependent Modulation of Early and Committed Effector T Cells in Experimental Autoimmune Uveitis. *Cellular Immunology* 178, 69–78 (1997).
- Yiangou, Y. et al. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6, 12 (2006).
- Young, C. N. J. & Górecki, D. C. P2RX7 Purinoceptor as a Therapeutic Target—The Second Coming? *Front. Chem.* 6, 248 (2018).
- Yu, Y. et al. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Research* 1194, 45–55 (2008).
- Zeng, S. et al. Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP) in Retinal Health and Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 577935 (2020).
- Zhang, L. et al. Complement anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR are required in the pathogenesis of experimental autoimmune uveitis. *Journal of Leukocyte Biology* 99, 447–454 (2016).

Zhang, Y. et al. Increased expression of P2X7 receptor in peripheral blood mononuclear cells correlates with clinical severity and serum levels of Th17-related cytokines in patients with myasthenia gravis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 157, 88–94 (2017).

Zhao, R., Liang, D. & Sun, D. Blockade of Extracellular ATP Effect by Oxidized ATP Effectively Mitigated Induced Mouse Experimental Autoimmune Uveitis (EAU). *PLoS ONE* 11, e0155953 (2016).

Zhou, R. et al. The Living Eye “Disarms” Uncommitted Autoreactive T Cells by Converting Them to Foxp3+ Regulatory Cells following Local Antigen Recognition. *The Journal of Immunology* 188, 1742–1750 (2012).

Standardization of Uveitis Nomenclature for Reporting Clinical Data. Results of the First International Workshop. *American Journal of Ophthalmology* 140, 509–516 (2005)

ANNEXES



P2X7-dependent immune pathways in retinal diseases

Paul-Alexandre Déchelle-Marquet, Xavier Guillonéau, Florian Sennlaub, Cécile Delarasse*

Sorbonne University, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

P2X7
Retina
Age-related macular degeneration
Uveitis
Macrophage
Microglia

ABSTRACT

Adenosine triphosphate (ATP) is a signalling molecule acting as a neurotransmitter but also as a danger signal. The purinergic receptor P2X7 is the main sensor of high concentration of ATP released by damaged cells. In the eye, P2X7 is expressed by resident microglia and immune cells that infiltrate the retina in disease such as age-related macular degeneration (AMD), a degenerative retinal disease, and uveitis, an inflammatory eye disease. Activation of P2X7 is involved in several physiological and pathological processes: phagocytosis, activation of the inflammasome NLRP3, release of pro-inflammatory mediators and cell death. The aim of this review is to discuss the potential involvement of P2X7 in the development of AMD and uveitis.

This article is part of the Special Issue on 'Purinergic Signaling: 50 years'.

1. Introduction

In 1972, Geoffrey Burnstock formulated the purinergic neurotransmission hypothesis. This concept proposed that adenosine 5' triphosphate (ATP) is not only an intracellular energy source but also acts as an extracellular neurotransmitter in the peripheral and central nervous systems (CNS) (Burnstock, 1972; Burnstock et al., 1972). This concept also called into question the Dale's Principle that one nerve only releases one neuro-transmitter, as Burnstock's work showed that ATP was co-released with various neurotransmitters in different populations of nerve fibers (Burnstock, 1976, 2007). At first, two types of purinergic receptors were described: P1 receptors selective for adenosine and P2 receptors selective for ATP/ADP (Burnstock and Kennedy, 1985). Eventually, pharmacological tools allowed to discriminate between different P2 receptors. The P2 family of receptors is divided in two subgroups, the ionotropic P2X receptors and the metabotropic P2Y receptors. Later it was recognized that, in addition to being a source of energy and a neurotransmitter, high amount of ATP also constitutes a danger signal when released by damaged and/or stressed cells and the P2X7 receptor (P2X7) is a sensor of this danger signal (Gallucci and Matzinger, 2001).

1.1. The P2X7 receptor

The P2X7 receptor (P2X7) belongs to the P2X receptor family of ATP-gated cation channels. Brief activation of P2X7 triggers an influx of Ca^{2+} and Na^+ , and an efflux of K^+ . The P2X7 receptor is structurally different

from the other P2X receptors by its intracellular C-terminal tail which is 200 amino acids longer. The structure of the carboxy-terminal portion of the P2X7 receptor obtained by single-particle cryoelectron microscopy contains an original fold called "ballast" which contains a dinuclear Zn ion complex and a pocket containing GTP/GDP (McCarthy et al., 2019). P2X7 has a reduced sensitivity to ATP and will only be activated by high extracellular concentration of ATP (EC50: 0.1–1 mM) compared to other P2 receptors (McCarthy et al., 2019).

The P2X7 receptor has the particularity to be involved in various functions (Di Virgilio et al., 2017; Kanellopoulos and Delarasse, 2019). Brief stimulation by ATP leads to the release of various proteins via different pathways: the proteolytic cleavage and release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 by activating the inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) (Di Virgilio, 2007; Ferrari et al., 1997a, 1997b), the metalloprotease-dependent shedding of ecto-domains of many cell surface proteins such as sAPP α (Darmellah et al., 2012; Delarasse et al., 2011), L-Selectin, CD23 (Gu et al., 1998), TNF α (Suzuki et al., 2004) and the production of IL-6 (Solini et al., 1999), reactive oxygen species (ROS) (Parvathani et al., 2003) and chemokines (Carvalho et al., 2021; Martin et al., 2019; Panenka et al., 2001). Prolonged activation of P2X7 can lead to cell death by apoptosis (Ferrari et al., 1999), lysis/necrosis (Delarasse et al., 2009; Di Virgilio et al., 1998) or pyroptosis (Yang et al., 2015) but also cell growth, especially for cancer cells (Baricordi et al., 1999; Di Virgilio and Adinolfi, 2017), depending on the microenvironment. In the absence of ATP and serum, P2X7 confers scavenger activity to monocytes and microglia (Gu and Wiley, 2018). P2X7-dependent

* Corresponding author.

E-mail address: cecile.delarasse@inserm.fr (C. Delarasse).

functions vary according to the cell type that express it, its expression level and the extracellular environment such as the ATP level and the presence of co-stimulatory mediators. (Di Virgilio et al., 2017; Kanellopoulos and Delarasse, 2019). The involvement of P2X7 has been reported in different pathologies of the eye: Age-related macular degeneration (AMD), uveitis, glaucoma and diabetic retinopathy. The role of P2X7 in glaucoma and diabetic retinopathy has been elegantly reviewed by Fletcher et al. (2019) and Tassetto et al. (2021). In the present review, we will provide an overview of the body of work about the functions of P2X7 in retinal diseases with a focus on Age-related macular degeneration (AMD), a degenerative retinal disease, and uveitis, an inflammatory eye disease.

1.2. P2X7 and age-related macular degeneration (AMD)

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex multifactorial retinal disease characterized by damage to the macula, the central retina, and by the presence of extracellular deposits called drusen localized between the retinal pigment epithelium (RPE) and the Bruch's membrane. Despite the immunosuppressive environment of the eye, AMD is associated with accumulation of mononuclear phagocytes (MPs) in the subretinal space (Guillonnet et al., 2017). The chronic presence of MPs contributes to the pathological processes and is associated with genetic and environmental factors. MPs participate to beneficial process by phagocytizing cellular debris and controlling their accumulation but can also display a deleterious phenotype by releasing pro-inflammatory mediators that promote neurodegeneration and pathological neovascularization.

P2X7, in its unactivated state, acts as a scavenger receptor and mediates phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by monocytes and macrophages, murine peritoneal macrophages, and microglia in the absence of ATP (Gu et al., 2011; Gu and Wiley, 2018; Janks et al., 2018). The P2X7 G150R and P2X4 Y315C polymorphisms have been shown to affect particle phagocytosis by monocytes carrying these variants and co-inheritance of these variants has been associated with late-stage AMD (Gu et al., 2013). In aged mice, lack of P2X7 leads to early AMD-like features such as Bruch's membrane thickening, loss of RPE cells and increased number of microglia/MPs in the subretinal space (Vessey et al., 2017). In addition, the phagocytotic activity of blood-borne macrophages from P2X7-deficient mice is reduced compared to those from wild-type mice. These findings suggest that P2X7-dependent phagocytic properties contribute to the clearance of debris in aged individuals and that failure of P2X7 function may be involved in the accumulation of drusen deposits, RPE cell dysfunction and the development of AMD features.

The CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) knockout mouse develops age- and light-induced, spontaneous subretinal MPs accumulation associated with photoreceptor degeneration similar to AMD (Combadiere et al., 2007). IL-1 β levels were significantly increased in the retina of these AMD models and injection of the IL-1 inhibitor IL-1Ra reduced the number of apoptotic photoreceptor cells (Eandi et al., 2016; Hu et al., 2015). P2X7 was up-regulated in MPs from CX3CR1-deficient mice leading to increased maturation and release of IL-1 β . In addition, treatment of CX3CR1-deficient mice with the P2X7 antagonist Blue Brilliant G (BBG) inhibited photoreceptor degeneration associated with subretinal inflammation without influencing MPs accumulation (Hu et al., 2015). This study suggests that up-regulation of P2X7 in microglia/MPs may have a pathogenic role in AMD through the release of IL-1 β release independently of MPs recruitment.

P2X7 is a key player in the activation of the NLRP3 inflammasome leading to the release of IL-1 β (Di Virgilio, 2007). NLRP3 level was shown to be increased in the RPE of patients with geographic atrophy (GA), the untreatable advanced stage of AMD, compared to aged-matched normal controls (Tarallo et al., 2012). Moreover, NLRP3 activation, by DICER1 deficit or Alu RNA, induces degeneration of the RPE in mice that mimics GA (Tarallo et al., 2012). P2X7-deficiency or

intravitreal delivery of the P2X7 antagonist A740003 confer protection against the RPE cell death induced by Alu RNA (Kerur et al., 2013). Consequently, P2X7 may contribute to RPE degeneration in GA through activation of the NLRP3 inflammasome.

The laser-induced choroidal neovascularization (CNV) model is a mouse model of wet AMD characterized by blood vessel formation from the choroid that disruptively invades the subretinal space and by the recruitment of MPs around the lesion. Currently, anti-VEGF treatments are used to control the growth and leakage of abnormal blood vessels in AMD. Interestingly, the level of VEGF-A is decreased in the RPE and the choroid of P2X7-deficient mice after laser-induced CNV without effect on the volume of the lesion (Mizutani et al., 2015). Previous studies have shown that P2X7 activation with P2X7 agonists, ATP or Bz-ATP, triggers the release of VEGF from primary human monocyte (Hill et al., 2010) and HEK cells expressing human P2X7 or mouse P2X7 (Adinolfi et al., 2012; Mizutani et al., 2015). Interestingly, in tumor cells, P2X7 expression confers an enhanced proliferation and angiogenesis linked to increased VEGF release (Adinolfi et al., 2012). Hence, P2X7 expression may contribute to blood vessel proliferation in the subretinal space in wet AMD.

To conclude, P2X7 may be involved in distinct pathological pathways in AMD such as phagocytosis, VEGF release, activation of NLRP3 and subsequent IL-1 β release. Intrinsic defect in P2X7-dependent phagocytosis may lead to accumulation of deposits and contribute to the development of AMD, while over-activation of P2X7 may take part in the deleterious pro-inflammatory response by promoting photoreceptor degeneration and choroidal neovascularization in advanced AMD (Fig. 1).

1.3. P2X7 and uveitis

Uveitis is an inflammatory disease of the eye that affects the uvea (anterior and intermediate uveitis) but also the retina (posterior uveitis). The inflammatory response can be driven by an immune response against a pathogen (virus or bacteria; infectious uveitis) or an autoimmune response against a self-antigen and an aberrant innate immune response triggered by microbes or danger signals (non-infectious uveitis) (Caspi, 2010). Patients with non-infectious uveitis frequently exhibit an auto-immune response against ocular antigens. Experimental Autoimmune Uveitis (EAU) is a model reproducing the main features of this uveitis subtype. The disease is induced by immunization of rodent with retinal antigen in presence of adjuvant and pertussis toxin leading to activation of autoreactive T-cells (Th1 and Th17) that will infiltrate the retina (Caspi, 2010).

Interestingly, treatment of mice, one day after EAU induction, with the P2X7 antagonist oxidized ATP (oATP) reduced the severity of EAU (Zhao et al., 2016). This was associated with reduced percentage of Th17 cells (IL-17⁺ T-cells) but not Th1 cells (IFN- γ ⁺ T-cells) in the spleen. In addition, autoreactive T-cells from oATP-treated mice exhibited reduced uveitogenic properties. Treatment with oATP not only directly modulated the T-cell response but also suppressed dendritic cells (DCs) functions and decreased IL-6 and IL-23 production. Thus, the autoreactive immune response could be partially controlled by P2X7 expressing DCs. Another study showed that the P2X7 antagonist BBG also decreased EAU severity (Takeda et al., 2018). Furthermore, the disease was less severe in P2X7-deficient mice than in Wild-Type (WT), even though the number of Th1, Th17 and Tregs cells were similar in the draining lymph nodes of EAU mice. Taken together, these studies suggest that P2X7 activation contributes to pathological processes during EAU.

Studies of the role of P2X7 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), an autoimmune model of multiple sclerosis, suggest that P2X7 may yet have functions in uveitis other than the ones described above. First, P2X7 could be involved in cell death of autoreactive T-cells. Indeed, Brosnan et al. described that P2X7-deficient mice were more susceptible to EAE due to a decreased number of apoptotic T

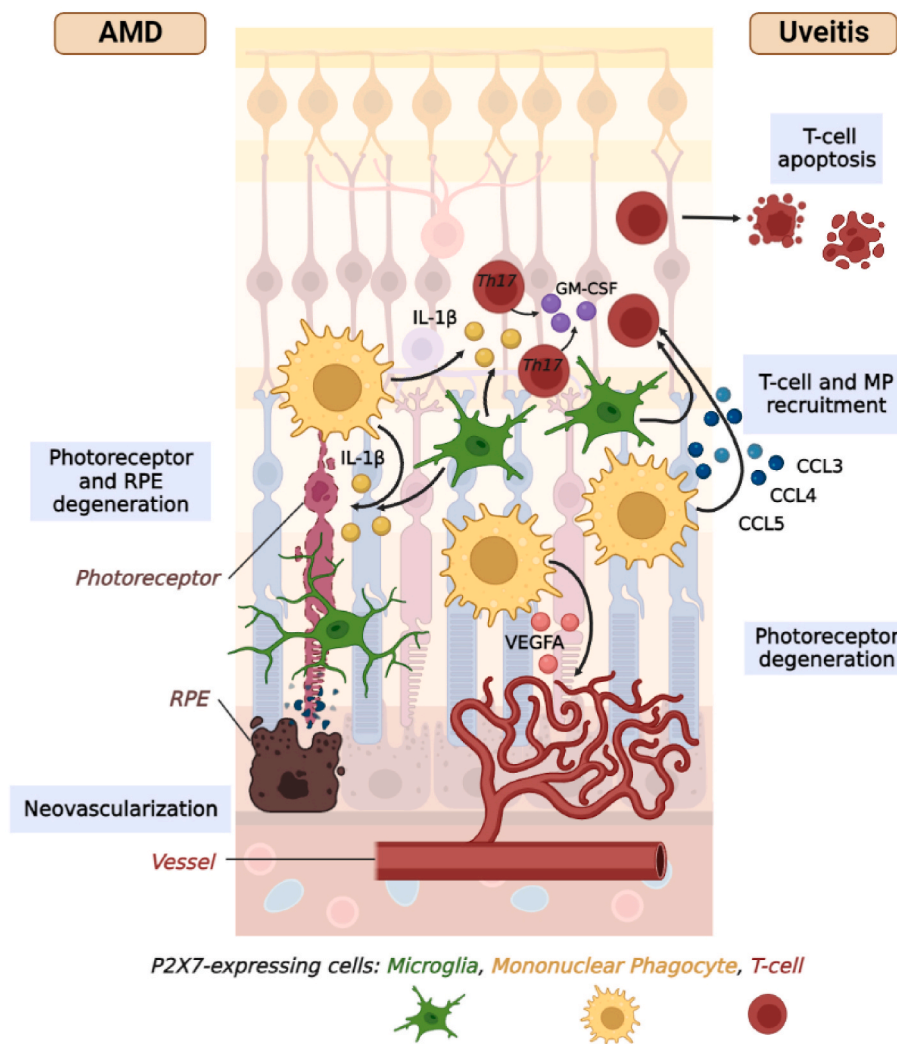


Fig. 1. P2X7 functions in ADM and Uveitis. High amount of ATP released from damaged cells activates P2X7 in the retina. P2X7 activates the inflammasome NLRP3 leading to the release of IL-1 β that may trigger photoreceptor and RPE degeneration and increases the pathogenicity of autoimmune T-cells. Activation of P2X7 expressed by T-cell may induce apoptosis of autoreactive T-cells. In addition, P2X7 induces the production of chemokines that may be involved in the recruitment of T-cells and MPs. P2X7 may also be implicated in the release of VEGF that contributes to neovascularization. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

lymphocytes in the brain and the spinal cord of P2X7-deficient mice compared to WT mice (Chen and Brosnan, 2006). Thereby, P2X7 could be involved in both initiation/activation of the T-cell response but could also control it by inducing apoptosis of infiltrating T-cells in the CNS.

During EAU, retinal-specific T-cells recruit pathogenic peripheral MPs in the eye and activate resident microglial cells leading to retinal damages. Expression of P2X7 by microglia and MPs may contribute to the development of the disease. Activation of P2X7 leads to the release of chemokines CCL2, CCL3 and CCL4 by microglia and astrocytes (Carvalho et al., 2021; Martin et al., 2019; Panenka et al., 2001). These chemokines are involved in the recruitment of T-cells and MPs. Therefore, P2X7 could contribute to the development of the inflammatory response in EAU by increasing infiltration of auto-reactive T-cells and macrophages in the retina.

Behçet’s disease is a multisystemic vascular inflammatory disease often associated with uveitis. Interestingly, Castrichini et al. observed an increased expression and activation of P2X7 in monocytes, and a consequent increased IL-1 β secretion in patients with Behçet’s disease (Castrichini et al., 2014). P2X7-dependent release of IL-1 β can directly induce retinal cell damages, but may also be involved in the autoimmune T cell response via the expression of the receptor IL-1R by T-cells (Pare et al., 2017). Indeed, myeloid-derived IL-1 β was shown to promote the expansion of encephalitogenic GM-CSF⁺ Th17 cells in EAE (Mufazalov et al., 2017) and to induce differentiation of Th17 cells at the expense of Treg cells in NOD mice that develop autoimmune diabetes (Bertin-Maghit et al., 2011). In consequence, P2X7 could increase the

pathogenicity of autoimmune T-cells response in uveitis by promoting the release of IL-1 β .

In EAE, infiltrating MPs and resident microglia have differential roles in the course of the disease. MPs initiate cell damage whereas microglia appear to clear debris and to promote tissue repair (Yamasaki et al., 2014). P2X7 stimulation may have a detrimental effect via the release of pro-inflammatory mediators by MPs but may contribute to the beneficial clearance of cell debris by microglia. Depending on the stage of the disease and the cells that express it, P2X7 might have different functions in uveitis.

Overall, inhibition of P2X7 appears to be a relevant therapeutic strategy in uveitis but the P2X7-dependent cellular and molecular pathways involved remain to be identified. In the acute phase, P2X7 could participate in the activation of pathogenic autoimmune T-cells, the recruitment of peripheral immune cells in the retina and the inflammatory responses that lead to retinal damages, but P2X7 could also be involved in the resolution phase by inducing autoreactive T-cells death and the removal of cellular debris (Fig. 1).

2. Conclusion

Expression of P2X7 was reported in neuronal cells within the retina, including retinal ganglion cells, amacrine cells and photoreceptors (Fletcher et al., 2019) but its presence still remains controversial (Kaczmarek-Hajek et al., 2018). One explanation is that P2X7 expression could be very low and/or very localized in neurons (subsynaptic

localization), making the protein difficult to detect. Thus, P2X7 expressed by neurons could be directly involved in photoreceptor death. In AMD and uveitis, P2X7 involvement was mostly related to its role in microglia and infiltrating MPs. Moreover, P2X7 mediates all macrophages functions that participate in the immune responses observed in AMD and uveitis: phagocytosis, release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α), recruitment of immune cells through the production of chemokines and potentially wound repair via VEGF release. Given the expression of P2X7 by Müller cells, astrocytes and endothelial cells, these cells may also participate in the development of the disease through the release of cytokines and VEGF (Tassetto et al., 2021).

In mammals, the retina has a very limited regenerative capacity. As the retina has a highly structured architecture with different layers of neural cells, the loss of any of these cell types leads to visual impairment and potentially blindness. To avoid immunopathogenic damages in the eye, the immune response must be tightly controlled. Resident microglia express low levels of pattern recognition receptors compared with peripheral macrophages, presumably to dampen immune responses and minimize collateral damage in the CNS (Martin et al., 2017). Under physiological conditions, P2X7 would play a role in microglia in the phagocytosis of cellular debris in the retina. Alteration of P2X7 properties could then lead to the development of defects in AMD, linked to its phagocytotic function. In pathological conditions of AMD and uveitis, there would be an augmented activation of P2X7 due to its increased expression in microglia/MPs and the release of large amounts of ATP from cells undergoing stress or death. Therefore, this increased immune response would contribute to pathological inflammation and angiogenesis.

Current treatments for AMD (anti-VEGF) and uveitis (corticosteroids) have significantly improved the reduction of vision in patients. However, these treatments have side effects with a significant risk of developing ocular hypertension, glaucoma and cataract and are ineffective in some subtypes of uveitis and in particular in atrophic AMD. New antagonists and P2X7 blocking antibodies are currently being developed and validated, and could be relevant therapeutic approaches for the treatment of retinal diseases.

Declaration of competing interest

No competing interests.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Sorbonne University, Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Programme Investissements d'Avenir IHU FOReSIGHT (ANR-18-IAHU-0001), Union Nationale des Aveugles et Déficiants Visuels (UNADEV) and Retina France.

References

- Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., Di Virgilio, F., 2012. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.* 72, 2957–2969.
- Baricordi, O.R., Melchiorri, L., Adinolfi, E., Falzoni, S., Chiozzi, P., Buell, G., Di Virgilio, F., 1999. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 33206–33208.
- Bertin-Maghit, S., Pang, D., O'Sullivan, B., Best, S., Duggan, E., Paul, S., Thomas, H., Kay, T.W., Harrison, L.C., Steptoe, R., Thomas, R., 2011. Interleukin-1 β produced in response to islet autoantigen presentation differentiates T-helper 17 cells at the expense of regulatory T-cells: implications for the timing of tolerizing immunotherapy. *Diabetes* 60, 248–257.
- Burnstock, G., 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509–581.
- Burnstock, G., 1976. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239–248.
- Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797.
- Burnstock, G., Kennedy, C., 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinergic? *Gen. Pharmacol.* 16, 433–440.
- Burnstock, G., Satchell, D.G., Smythe, A., 1972. A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br. J. Pharmacol.* 46, 234–242.
- Carvalho, K., Martin, E., Ces, A., Sarrazin, N., Lagouërou, P., Nous, C., Boucherit, L., Youssef, I., Prigent, A., Favier, E., Eddarkaoui, S., Gaurvit, T., Vieau, D., Boluda, S., Neuro, C.E.B.B.B., Huin, V., Fontaine, B., Buee, L., Delatour, B., Dutar, P., Sennlaub, F., Guillonneau, X., Blum, D., Delarasse, C., 2021. P2X7-deficiency improves plasticity and cognitive abilities in a mouse model of Tauopathy. *Prog. Neurobiol.* 206, 102139.
- Caspi, R.R., 2010. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J. Clin. Invest.* 120, 3073–3083.
- Castrichini, M., Lazzarini, P.E., Gamberucci, A., Capecci, P.L., Franceschini, R., Natale, M., Hammoud, M., Moramarco, A., Zimbone, S., Giancchetti, E., Montilli, C., Ricci, G., Selvi, E., Cantarini, L., Galeazzi, M., Laghi-Pasini, F., 2014. The purinergic P2x7 receptor is expressed on monocytes in Behcet's disease and is modulated by TNF-alpha. *Eur. J. Immunol.* 44, 227–238.
- Chen, L., Brosnan, C.F., 2006. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R $^{-/-}$ mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 3115–3126.
- Combadiere, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodero, M., Pezard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., Debre, P., Sirinyan, M., Deterre, P., Ferroukhi, T., Cohen, S.Y., Chauvaud, D., Jeanny, J.C., Chemtob, S., Behar-Cohen, F., Sennlaub, F., 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 117, 2920–2928.
- Darmellah, A., Rayah, A., Auger, R., Cuif, M.H., Prigent, M., Arpin, M., Alcover, A., Delarasse, C., Kanellopoulos, J.M., 2012. Ezrin/radixin/moesin are required for the purinergic P2X7 receptor (P2X7R)-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 287, 34583–34595.
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B., Kanellopoulos, J.M., 2011. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 286, 2596–2606.
- Delarasse, C., Gonnord, P., Galante, M., Auger, R., Daniel, H., Motta, I., Kanellopoulos, J. M., 2009. Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J. Neurochem.* 109, 846–857.
- Di Virgilio, F., 2007. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465–472.
- Di Virgilio, F., Adinolfi, E., 2017. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36, 293–303.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J.M., Venketaraman, V., Baricordi, O.R., 1998. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ.* 5, 191–199.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A.C., Giuliani, A.L., Falzoni, S., 2017. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity* 47, 15–31.
- Eandi, C.M., Charles Messance, H., Augustin, S., Dominguez, E., Lavalette, S., Forster, V., Hu, S.J., Siqueros, L., Craft, C.M., Sahel, J.A., Tadayoni, R., Paques, M., Guillonneau, X., Sennlaub, F., 2016. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *Elife* 5.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O.R., Di Virgilio, F., 1997a. Extracellular ATP triggers IL-1 β release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* 159, 1451–1458.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., Di Virgilio, F., 1997b. Purinergic modulation of interleukin-1 β release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* 185, 579–582.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M.K., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., 1999. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447, 71–75.
- Fletcher, E.L., Wang, A.Y., Jobling, A.I., Rutar, M.V., Greferath, U., Gu, B., Vessey, K.A., 2019. Targeting P2X7 receptors as a means for treating retinal disease. *Drug Discov. Today* 24, 1598–1605.
- Gallucci, S., Matzinger, P., 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 114–119.
- 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, 946–951.
- Gu, B.J., Baird, P.N., Vessey, K.A., Skarratt, K.K., Fletcher, E.L., Fuller, S.J., Richardson, A.J., Guymer, R.H., Wiley, J.S., 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. J.* 27, 1479–1487.
- Gu, B.J., Saunders, B.M., Petrou, S., Wiley, J.S., 2011. P2X(7) is a scavenger receptor for apoptotic cells in the absence of its ligand, extracellular ATP. *J. Immunol.* 187, 2365–2375.
- Gu, B.J., Wiley, J.S., 2018. P2X7 as a scavenger receptor for innate phagocytosis in the brain. *Br. J. Pharmacol.* 175, 4195–4208.
- Guillonneau, X., Eandi, C.M., Paques, M., Sahel, J.A., Sapiéha, P., Sennlaub, F., 2017. On phagocytes and macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 61, 98–128.
- Hill, L.M., Gavalá, M.L., Lenertz, L.Y., Bertics, P.J., 2010. Extracellular ATP may contribute to tissue repair by rapidly stimulating purinergic receptor X7-dependent vascular endothelial growth factor release from primary human monocytes. *J. Immunol.* 185, 3028–3034.
- Hu, S.J., Calippe, B., Lavalette, S., Roubeix, C., Montassar, F., Housset, M., Levy, O., Delarasse, C., Paques, M., Sahel, J.A., Sennlaub, F., Guillonneau, X., 2015.

- Upregulation of P2RX7 in cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1beta secretion and photoreceptor neurodegeneration. *J. Neurosci.* 35, 6987–6996.
- Janks, L., Sharma, C.V.R., Egan, T.M., 2018. A central role for P2X7 receptors in human microglia. *J. Neuroinflammation* 15, 325.
- Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., Bruzzone, S., Engel, T., Jooss, T., Krautloher, A., Schuster, S., Magnus, T., Stadelmann, C., Sirko, S., Koch-Nolte, F., Eulenburger, V., Nicke, A., 2018. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife* 7.
- Kanellopoulos, J.M., Delarasse, C., 2019. Pleiotropic roles of P2X7 in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 401.
- Kerur, N., Hirano, Y., Tarallo, V., Fowler, B.J., Bastos-Carvalho, A., Yasuma, T., Yasuma, R., Kim, Y., Hinton, D.R., Kirschning, C.J., Gelfand, B.D., Ambati, J., 2013. TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 7395–7401.
- Martin, E., Amar, M., Dalle, C., Youssef, I., Boucher, C., Le Duigou, C., Bruckner, M., Prigent, A., Szdovitch, V., Halle, A., Kanellopoulos, J.M., Fontaine, B., Delatour, B., Delarasse, C., 2019. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Psychiatr.* 24, 108–125.
- Martin, E., Boucher, C., Fontaine, B., Delarasse, C., 2017. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: effects of aging and amyloid pathology. *Aging Cell* 16, 27–38.
- McCarthy, A.E., Yoshioka, C., Mansoor, S.E., 2019. Full-length P2X7 structures reveal how palmitoylation prevents channel desensitization. *Cell* 179, 659–670 e613.
- Mizutani, T., Fowler, B.J., Kim, Y., Yasuma, R., Krueger, L.A., Gelfand, B.D., Ambati, J., 2015. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors suppress laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 7122–7129.
- Mufazalov, I.A., Schelmbauer, C., Regen, T., Kuschmann, J., Wanke, F., Gabriel, L.A., Hauptmann, J., Muller, W., Pinteaux, E., Kurschus, F.C., Waisman, A., 2017. IL-1 signaling is critical for expansion but not generation of autoreactive GM-CSF+ Th17 cells. *EMBO J.* 36, 102–115.
- Panenska, W., Jijon, H., Herx, L.M., Armstrong, J.N., Feighan, D., Wei, T., Yong, V.W., Ransohoff, R.M., MacVicar, B.A., 2001. P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 21, 7135–7142.
- Pare, A., Mailhot, B., Levesque, S.A., Lacroix, S., 2017. Involvement of the IL-1 system in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: breaking the vicious cycle between IL-1beta and GM-CSF. *Brain Behav. Immun.* 62, 1–8.
- Parvathenani, L.K., Tertysnikova, S., Greco, C.R., Roberts, S.B., Robertson, B., Posmantur, R., 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 13309–13317.
- Solini, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Fellini, R., Di Virgilio, F., 1999. Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 3), 297–305.
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., Nakata, Y., 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24, 1–7.
- Takeda, A., Yamada, H., Hasegawa, E., Arima, M., Notomi, S., Myojin, S., Yoshimura, T., Hisatomi, T., Enaida, H., Yanai, R., Kimura, K., Ishibashi, T., Sonoda, K.H., 2018. Crucial role of P2X7 receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis. *Jpn. J. Ophthalmol.* 62, 398–406.
- Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B.D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., Cho, W.G., Kaneko, H., Fowler, B.J., Bogdanovich, S., Albuquerque, R.J., Hauswirth, W.W., Chiodo, V.A., Kugel, J.F., Goodrich, J.A., Ponicsan, S.L., Chaudhuri, G., Murphy, M.P., Dunaief, J. L., Ambati, B.K., Ogura, Y., Yoo, J.W., Lee, D.K., Provost, P., Hinton, D.R., Nunez, G., Baffi, J.Z., Kleinman, M.E., Ambati, J., 2012. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 149, 847–859.
- Tassetto, M., Scialdone, A., Solini, A., Di Virgilio, F., 2021. The P2X7 receptor: a promising pharmacological target in diabetic retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 22.
- Vessey, K.A., Gu, B.J., Jobling, A.I., Phipps, J.A., Greferath, U., Tran, M.X., Dixon, M.A., Baird, P.N., Guymier, R.H., Wiley, J.S., Fletcher, E.L., 2017. Loss of function of P2X7 receptor scavenger activity in aging mice: a novel model for investigating the early pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am. J. Pathol.* 187, 1670–1685.
- Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A.M., Cialic, R., Wu, P.M., Doykan, C.E., Lin, J., Cotleur, A.C., Kidd, G., Zorlu, M.M., Sun, N., Hu, W., Liu, L., Lee, J.C., Taylor, S.E., Uehlein, L., Dixon, D., Gu, J., Floruta, C.M., Zhu, M., Charo, I. F., Weiner, H.L., Ransohoff, R.M., 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J. Exp. Med.* 211, 1533–1549.
- Yang, D., He, Y., Munoz-Planillo, R., Liu, Q., Nunez, G., 2015. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. *Immunity* 43, 923–932.
- Zhao, R., Liang, D., Sun, D., 2016. Blockade of extracellular ATP effect by oxidized ATP effectively mitigated induced mouse experimental autoimmune uveitis (EAU). *PLoS One* 11, e0155953.



Review

The P2X7 Receptor, a Multifaceted Receptor in Alzheimer's Disease

Kaitryn E. Ronning , Paul-Alexandre Déchelle-Marquet, Yueshen Che, Xavier Guillonnet , Florian Sennlaub and Cécile Delarasse *

INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Sorbonne University, F-75012 Paris, France; kaitryn.ronning@inserm.fr (K.E.R.); paul-alexandre.dechelle-marquet@inserm.fr (P.-A.D.-M.); yueshen.che@inserm.fr (Y.C.); xavier.guillonnet@inserm.fr (X.G.); florian.sennlaub@inserm.fr (F.S.)

* Correspondence: cecile.delarasse@inserm.fr

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by impaired episodic memory and two pathological lesions: amyloid plaques and neurofibrillary tangles. In AD, damaged neurons and the accumulation of amyloid β ($A\beta$) peptides cause a significant release of high amounts of extracellular ATP, which acts as a danger signal. The purinergic receptor P2X7 is the main sensor of high concentrations of ATP, and P2X7 has been shown to be upregulated in the brains of AD patients, contributing to the disease's pathological processes. Further, there are many polymorphisms of the *P2X7* gene that impact the risk of developing AD. P2X7 can directly modulate $A\beta$ plaques and Tau protein lesions as well as the inflammatory response by regulating NLRP3 inflammasome and the expression of several chemokines. The significant role of microglial P2X7 in AD has been well established, although other cell types may also be important in P2X7-mediated mechanisms. In this review, we will discuss the different P2X7-dependent pathways involved in the development of AD.

Keywords: purinergic receptor; Alzheimer's disease; inflammation; microglia; cytokines; chemokines



Citation: Ronning, K.E.; Déchelle-Marquet, P.-A.; Che, Y.; Guillonnet, X.; Sennlaub, F.; Delarasse, C. The P2X7 Receptor, a Multifaceted Receptor in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11747. <https://doi.org/10.3390/ijms241411747>

Academic Editor: Francesco Di Virgilio

Received: 1 July 2023
Revised: 13 July 2023
Accepted: 19 July 2023
Published: 21 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. The Purinergic Receptor P2X7

The purinergic receptor P2X7 is an ATP-gated cation channel that allows the influx of Na^+ and Ca^{2+} and efflux of K^+ and the formation of a non-selective pore allowing the entry of molecules up to 900 Da. Unlike other P2 receptors, P2X7 has a lower sensitivity to ATP and thus requires high levels of extracellular ATP (>0.1 mM) for activation [1,2]. Normally, there is a delicate balance of ATP concentrations between the intracellular range (3–10 mM) and the extracellular range (20–50 nM). Therefore, the release of ATP at these high levels serves as a danger signal when it is released by damaged or stressed cells, and P2X7 then detects these dramatic increases in extracellular ATP [3]. The properties of P2X7 can depend on the presence of ATP and ATP levels [4]. In mouse neural progenitor cells, P2X7 is involved in phagocytosis, cell proliferation, or cell death with the increasing concentration of extracellular ATP. However, P2X7-deficient mice are healthy and display no overt neurological phenotypes, suggesting that P2X7 does not play a major role in healthy central nervous system function [5]. Instead, the functions of P2X7 appear to be most important during pathological processes in the presence of a high amount of ATP. In particular, P2X7 has garnered significant attention in the field of immunology due to its broad expression in immune cells and its main involvement in inflammatory processes [6]. It acts as a key component in the activation of the inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), leading to the activation of caspase 1 and the release of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 [7,8]. Stimulating P2X7 also triggers the release of various pro-inflammatory substances like TNF α [9], IL-6 [10], CCL2 [11], and an excitotoxic level of glutamate [12,13] and the production of reactive oxygen species (ROS) [14,15]. These mediators contribute to neuroinflammation, reactive

gliosis, and cell death. Prolonged P2X7 activation can also lead to cell death by apoptosis or lysis/necrosis depending on the cell type expressing it [8]. Interestingly, P2X7 in monocytes and microglia exhibits scavenger activity in the absence of ATP and serum [16]. The various functions associated with the properties of P2X7 have been shown to be implicated in a wide range of neurological and neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease (AD), suggesting that this receptor may be involved in pathological processes [17].

2. Alzheimer's Disease

AD is a neurodegenerative disease associated with age-related cognitive deficits, especially memory loss. AD is characterized by the presence in the brain of amyloid plaques and neurofibrillary lesions, leading to synaptic deficits. Amyloid plaques are formed by the accumulation of extracellular aggregates of β -amyloid ($A\beta$) peptides, resulting from the sequential proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) by β and γ secretases. In contrast to $A\beta$ peptides, the soluble fragment of APP (sAPP α), generated by α -secretase, appears to have neurotrophic and neuroprotective properties [18]. Neurofibrillary lesions consist of intraneuronal fibrillar aggregates of hyperphosphorylated and abnormally phosphorylated Tau proteins. Tau, a microtubule-associated protein, plays a critical role in stabilizing the microtubule network and facilitating the transport of substances along axons. The progression of the tau pathology in the brain, according to Braak stages, correlates with cognitive impairments in AD patients [19], suggesting an instrumental role in underlying synaptic dysfunctions.

3. The P2X7 Purinergic Receptor and AD

P2X7 levels are elevated in AD, and it has been strongly implicated in AD, particularly due to its involvement in inflammatory processes.

3.1. P2X7 Expression

The initial indication that P2X7 might play a role in AD came from its elevated expression in both animal models of AD and AD patients. Increased levels of *P2rx7* mRNA and P2X7 protein were first demonstrated in different mouse models of AD, specifically the transgenic mouse lines that develop amyloid plaques Tg2576 (Prnp-HuAPP*KM670/671NL) [14], APPSwe/PSEN1dE9 (Prnp-Mo/HuAPP*KM670/671NL, Prnp-HuPSEN1* Δ E9) [15], APPPS1 (Thy1-HuAPP*KM670/671NL, Thy1-HuPSEN1*L166P) [20], and J20 (PDGF-HuAPP*KM670/671NL and V717F) [21]. Additionally, the expression of P2X7 significantly rises in the rat's brain after intra-hippocampal injection of $A\beta$ peptides, indicating that $A\beta$ peptides themselves can induce the upregulation of P2X7 [22]. Given the importance of Tau tangles in the pathophysiology of AD, the interaction between P2X7 and these lesions has also been investigated. In the mouse models P301S (Prnp-HuMAPT*P301S, also known as PS19) and THY-Tau22 (Thy1-HuMAPT*G272V and P301S), increased levels of P2X7 were specifically associated with Tau pathology [23,24]. In further support of an increase in the P2X7 protein in models of AD, an iodinated radiotracer specific to P2X7 ([123I]TZ6019) has been developed, which revealed a 35% higher binding in the brain of P301S mice compared to control mice [25]. Furthermore, a significant upregulation of P2X7 has been observed in the cortex and hippocampus of AD patients, both in the plaque cores and surrounding amyloid lesions, as well as in proximity to neurofibrillary degeneration [20–22,24]. Finally, increased P2X7 levels have also been identified in the brains of patients with other various tauopathies, including frontotemporal lobar degeneration, Pick's disease, and progressive supranuclear palsy [23,24], further supporting the link between Tau and P2X7. Interestingly, while P2X7 is upregulated in response to AD-specific pathological lesions, the following activation of the receptor by pathological levels of extracellular ATP may in turn further contribute to the progression of AD.

3.2. P2X7 and Genetic Risk Factors

The familial form of AD occurs due to mutations in either the *APP* gene or genes such as *PSEN1* and *PSEN2*, which encode enzymes responsible for generating the A β peptide. Other genetic risk factors are also associated with AD, the most significant being the allelic form of APOE. In addition, genome-wide association studies (GWASs) have highlighted other genes implicated in inflammatory processes, suggesting a significant role of inflammation in neurodegenerative processes during AD [26].

The human *P2X7* gene exhibits over 150 non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) [27]. These SNPs can impact a wide variety of P2X7 properties such as agonist-binding affinity [28], trafficking to the cell surface [29], ion channel activity [30], and permeability of the pore [6,31] (key AD-relevant SNPs summarized in Table 1).

Table 1. Summary of key *P2X7* SNPs with relevance to AD.

SNP	rs Number	Amino Acid Change	Affected Region of P2X7 Protein	Change in Function	Associated AD Risk	Reference
1513A>C	rs3751143	Glu496Ala	Carboxyl-terminal tail	Loss of function	Decreased risk of AD	[32]
489C>T	rs208294	His155Tyr	Extracellular loop	Gain of function	Increased risk of AD	[33]
474G>A	rs28360447	Gly150Arg	Extracellular loop	Loss of function	Increased risk of AD	[30]

Two of the most studied *P2X7* SNPs change the formation and function of the channel pore. One of these is the 1513A>C polymorphism, which causes the amino acid change Glu496Ala in the carboxyl-terminal tail of P2X7 [32]. While the channel properties remain unaffected, this polymorphism confers a loss of function, affecting pore formation and cell death induction [32,34]. Interestingly, this SNP has also been associated with other inflammatory pathologies such as chronic lymphocytic leukemia and tuberculosis [35,36]. Another is the SNP 489C>T, which causes the amino acid change His155Tyr in the extracellular loop of P2X7 and confers a gain of function, increasing Ca²⁺ influx and pore formation [33]. The frequency of both of these SNPs was analyzed in 84 AD patients and 148 age-matched healthy controls. The presence of the 1513A>C allele (Glu496Ala) (loss of function) decreased the risk of developing AD by approximately four times in the absence of the 489C>T polymorphism [37], suggesting that some specific property of P2X7, potentially pro-inflammatory, may contribute to the development of AD.

P2X7 has a scavenger activity in the absence of serum, and this can also be affected by genetic polymorphisms. Specifically, a P2X7 (Gly150Arg)—P2X4 (Tyr315Cys) haplotype is associated with loss of P2X7-mediated phagocytosis [38]. This Gly150Arg mutation is also localized in the extracellular loop of P2X7. These findings indicate that impaired phagocytosis, which contributes to the defect in A β peptide clearance and leads to the increased accumulation of aggregates in the brain of AD patients, may in part be caused by P2X7 dysfunction [16].

In contrast to the above, a recent study determining a polygenic risk score based on 12 *P2X7* SNPs and 1 *P2X4* SNP in a cohort of 902 subject controls and 328 AD patients did not provide evidence of an association between *P2X7* and the risk of developing AD [39]. However, identifying specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) is not easy due to the large number of *P2X7* variants that can be associated with gain or loss of functions. Furthermore, some of these variants are very rare in the general population, requiring a large number of subjects to be studied in order to demonstrate their potential involvement. In another recent study, an analysis was performed specifically on the frequency of the loss-of-function 1513A>C and 1405A>G SNPs and the gain-of-function 489C>T and 1068G>A SNPs in the aged population [40]. The authors highlighted a significant increase in the hypomorphic 1513CC SNP frequency with age in a European/USA Caucasian cohort. However, no correlation was observed when subjects from more countries were included in the analysis. These findings suggest that in low-income countries, having a functional P2X7

might be beneficial to protect against infections such as Plasmodium, Mycobacterium, and Chlamydia, while in high-income countries with an older population, an anti-inflammatory P2X7 phenotype is selected for, conferring protection against chronic inflammatory diseases such as AD [40].

Altogether, these genetic analyses suggest that P2X7 may play a role in the development of AD, particularly through its involvement in the immune system. However, these studies have not been able to determine the exact role of P2X7 in these inflammatory responses during the course of the disease.

3.3. P2X7 and Amyloid Plaques

One of the characteristic lesions found in AD, amyloid plaques, is specifically composed of A β peptides. A β peptides derive from the amyloidogenic processing of APP by β and γ secretases, while alternative cleavage by α secretase produces a soluble neurotrophic and neuroprotective fragment, sAPP α , which prevents the formation of A β peptides [18]. P2X7 can affect A β build-up via this and other pathways. In our in vitro studies, we demonstrated that short-term stimulation (less than 30 min) of P2X7 activates an α -secretase enzyme, which cleaves APP at a specific site within the A β peptide sequence [41]. This P2X7-dependent non-amyloidogenic processing involved the activation of the Rho kinase, MAP kinases ERK1/2, and JNK, leading to the recruitment of Ezrin, Radixin, and Moesin proteins and subsequent PI3 kinase activity [41,42]. Conversely, Leon-Otegui et al. showed in their in vitro study that prolonged activation of P2X7 (4 h) has the opposite effect, resulting in a decrease in α -secretase activity through GSK3 kinase and an increase in the production of A β peptides [43,44].

In vivo in J20 mice, an amyloid mouse model, the administration of the P2X7 antagonist brilliant blue-G (BBG) for 4 months resulted in a reduction in A β load, which is correlated with GSK3 activity as observed in vitro [44]. The effects of knocking out P2X7 in another AD mouse model, APPPS1 mice, also led to a decrease in A β plaques and A β peptide levels, and this effect was unlikely to be attributed to the modulation of APP cleavage [20].

The inconsistencies sometimes observed between results obtained in vitro and in vivo could be explained by the diverse roles of P2X7 in the brain, which depend on the local ATP concentration as well as cofactors and the activation state of P2X7-expressing cells [8]. Despite some differences, most studies suggest that inhibiting P2X7 in a pathological context decreases the accumulation of A β peptides.

3.4. P2X7 and Tauopathy

The impact of P2X7 inactivation on the development of Tau pathology has also been assessed. In THY-Tau22 mice, the absence of P2X7 had a mild effect on Tau phosphorylation in the hippocampus [23]. In another Tau mouse model, P301S Tau mice, treatment at 3 months or 9 months of age with the specific P2X7 antagonist GSK1482160 or knockout of P2X7 reduced the accumulation of misfolded Tau protein and the rate of intraneuronal Tau protein phosphorylation in the hippocampus [24,45]. In agreement with the hypothesis that P2X7 may promote Tau accumulation, increased levels of P2X7 in P301S mice exacerbated Tau pathology [24]. There are multiple pathways/mechanisms by which P2X7 may augment Tau pathology. In P301S mice, the involvement of P2X7 in Tau phosphorylation is related at least in part to P2X7-dependent GSK3 activity, similar to what has been observed in P2X7-dependent modulation of A β in vitro and in J20 mice [24]. An additional possible mechanism by which P2X7 promotes Tau accumulation is that the activation of P2X7 induces the release of exosomes containing Tau [45]. Taken together, these findings suggest that inhibiting P2X7 could have a beneficial impact on Tau lesions as well as the A β plaques.

3.5. P2X7 and Synaptic Functions

The presence of A β plaques and neurofibrillary tangles contributes to the impairment of synaptic functions in AD. Recent studies have raised the possibility that inhibiting P2X7 could ultimately enhance cognitive function in AD by rescuing synaptic plasticity and promoting neuronal survival. The effect of knockout or inhibition of P2X7 was initially assessed on neuronal impairment in AD mouse models. Firstly, *ex vivo* electrophysiological experiments conducted on acute hippocampal slice preparations have demonstrated that the absence of P2X7 rescues deficits in long-term synaptic plasticity in APPPS1 mice and long-term synaptic plasticity and depression in THY-Tau22 mice [20,23]. APPPS1 mice showed synaptic damages as assessed by PSD95 immunoreactivity in the hippocampus, which was rescued in the absence of P2X7 [20]. In addition, P2X7 inhibition or knockout also rescued the loss of hippocampal neurons in P301S mice, an effect in part mediated by preventing impairments of the ubiquitin-proteasome system [24,46].

Consistent with these findings, several behavioral tests have shown that inhibiting P2X7 effectively reduces cognitive impairments observed across these AD models. Long-term spatial memory performance assessed through the Morris water maze test revealed that a lack of P2X7 rescues memory deficits in both amyloid APPPS1 and tauopathy THY-Tau22 mouse models [20,23]. In P301S mice, a genetic or pharmacological blockade of P2X7 using GSK1482160 restored cognitive deficits in Y-maze and novel object recognition tests [24,45], while increased levels of P2X7 exacerbated memory deficits [24]. Therefore, inhibiting P2X7 not only reduces pathological AD lesions but also improves synaptic plasticity in the hippocampus and rescues memory deficits.

3.6. P2X7 and the Inflammasome NLRP3

Both *in vitro* and *in vivo* experiments have provided evidence that the activation of the inflammasome NLRP3 contributes to the pathological inflammatory response mediated by A β peptides [47,48]. One critical component of this inflammatory response is the A β -induced secretion of IL-1 β [49]. P2X7 has emerged as a major player in NLRP3 activation and has been shown to contribute to the release of IL-1 β in a wide range of models of neurodegenerative diseases [8,50]. Specifically, in models of AD, P2X7 plays a key role in A β -induced IL-1 β secretion [49,51]. Intra-hippocampal injection of A β peptides increases IL-1 β levels in the brains of wild-type animals but not in P2X7 knockout mice [51]. Similarly, treatment of J20 mice with BBG resulted in a significant decrease in IL-1 β levels [44]. Also, in P301S mice, both the pharmacological blockade and knockout of P2X7 reversed the increase in IL-1 β levels observed in this model [24]. Altogether, these findings suggest that P2X7 may regulate IL-1 β release in AD. Mechanistically, the A β -induced secretion of IL-1 β is mediated by microglia, and, indeed, the microglial release of IL-1 β is inhibited by the P2X7 antagonist oATP and P2X7 knockout [49,51].

However, inhibiting P2X7 does not ameliorate the pathological inflammatory response in all AD models. For example, the cerebral levels of IL-1 β were similar between APPPS1 mice and P2X7-deficient APPPS1 mice [20]. Moreover, no differences were observed in the mRNA levels of each component of the NLRP3 complex (Asc, Nlrp3, Caspase1, and Il-1 β) between THY-Tau22 mice expressing or lacking P2X7 [23]. The differences observed in the involvement of P2X7-dependent IL-1 β release in these models can be attributed to the varying levels of inflammation, notably the IL-1 β level specific to each model. It is possible that in more inflammatory models such as intra-hippocampal injection of A β , J20, and P301S mice, P2X7 would have a significant role in the release of IL-1 β , contrary to less aggressive models like APPPS1 and THY-Tau22 mice (<https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>, accessed on 10 June 2023). Taken together, these findings suggest that P2X7 can regulate the pathological response associated with IL-1 β in AD, especially in more inflammatory states.

3.7. P2X7 and Chemokines

Chemokines, a family of chemotactic cytokines, also participate in the development of AD [52]. The chemokines CCL3, CCL4, and CCL5 have particular importance in AD pathogenesis. These chemokines are upregulated in the brains of both amyloid (APP^{Swe}/PSEN1^{dE9} and APP^{PS1}) and Tau (THY-Tau22) models compared to control mice [53,54] and in the brain of AD patients [55]. Moreover, intracerebroventricular injection of A β peptides in mice induces increased levels of CCL3 and CCR5, the shared receptor for CCL3, CCL4, and CCL5. These chemokines play an important role in the loss of cognitive function in AD. The loss of CCL3 or CCR5 rescues the cognitive impairments and synaptic dysfunctions and reduces the inflammatory response induced by A β peptides [56]. Intracerebroventricular injection of CCL3 in mice impairs long-term plasticity and spatial memory, which can be alleviated by the CCR5 antagonist maraviroc [57]. The administration of maraviroc also reduces Tau hyperphosphorylation in THY-Tau22 mice [23].

The production of these chemokines in AD is P2X7-dependent, predominantly due to P2X7 activation on glial cells. P2X7 deficiency primarily impacts the production of CCL3, CCL4, and CCL5 in the brain of 15-month-old APP^{PS1} mice [20] and the expression of CCL4 in the hippocampus of 8-month-old THY-Tau22 mice [23]. The stimulation of glial cells, rat astrocytes, and microglia, with the P2X7 antagonist benzoyl-benzoyl ATP (Bz-ATP), induces CCL3 release that was reversed by P2X7 antagonists [58,59]. Through the use of P2X7-deficient mice, we demonstrated the specific involvement of P2X7 in the production of CCL3 in astrocytes and microglial cells and CCL4 in microglia in response to P2X7 agonists ATP and Bz-ATP [20,23]. Interestingly, we showed that A β peptides also induced CCL3 release but not from P2X7-deficient glial cells [20].

The P2X7-dependent production of chemokines could directly influence cognitive functions, but also, chemokines could contribute to cognitive impairments in AD through the recruitment of pathogenic T-cells. CCL3 is overexpressed in peripheral T-cells of AD patients and may facilitate T lymphocyte infiltration into the brain [60]. Pathological infiltration of CD8⁺ T lymphocytes in THY-Tau22 mice correlates with cognitive impairments, which can be improved by depleting these lymphocytes [54]. The improvement in cognitive impairment observed in P2X7-deficient APP^{PS1} mice could be attributed to the lower level of CCL3 production associated with a reduction in CD8⁺ T cells in the brain [20]. These results shed light on a new role of P2X7 in AD pathology through the production of chemokines.

3.8. P2X7 and Microglia

Although the increase in P2X7 levels in AD is well established, the cell types expressing P2X7 in the central nervous system have remained a subject of intense discussion for many years [61,62], primarily due to the lack of high selectivity of anti-P2X7 antibodies. Also, the amount of P2X7 can vary depending on the pathophysiological context, which adds complexity to the interpretation of the different studies. Different approaches have been developed to address this question, such as P2X7 transgenic reporter mice [21,63,64] and P2X7-specific nanobodies [64]. Currently, there is not much evidence for the role of P2X7 expression by neurons in AD, but more investigation is necessary to conclude more definitively the importance of neuronal P2X7 [61,62]. Using RNAscope ISH, we demonstrated an increase in P2X7 mRNA in microglia and astrocytes in a mouse model of AD [20]. Moreover, the P2X7 protein was detected in microglia and astrocytes in the cortex of patients with AD or frontotemporal lobar degeneration [20,23]. In general, microglia exhibit the highest levels of P2X7 in the brain [65,66]. Thus, the observed increase in P2X7 in glial cells suggests their potential contribution to the pathogenesis of AD.

Several of the critical pathogenic functions of P2X7 could be mediated by P2X7 specifically expressed on microglia, including the release of IL-1 β and chemokines and the secretion of Tau-containing exosomes (see previous paragraphs) (Figure 1 and Table 2) [20,23,24,44,45]. Thus, inhibiting microglial P2X7 could be beneficial for many

facets of AD. The importance of microglial P2X7 is further underscored by the alternate role P2X7 can play in phagocytosis [16]. While the pro-inflammatory effects of P2X7 are predominantly mediated by the open state of the receptor, the scavenger activity of P2X7 is likely attributed to its closed state. Indeed, Gu et al. showed that P2X7 acts as a scavenger receptor in the absence of its ligand ATP [67]. Following ATP binding, the conformational change in P2X7 may induce the dissociation of the non-muscle myosin heavy chain from the P2X7 complex, which is needed for phagocytosis [16,68]. Furthermore, the inhibition of P2X7 in the presence of its ligand appears to reverse the P2X7 activation state and restore its phagocytic function [67]. Interestingly, the inhibition of P2X7 in a primary mouse microglial cell culture using siRNA or the antagonist BBG enhanced the phagocytosis of A β peptides in the presence of Bz-ATP [69]. In addition, in P301S mice, the inhibition of P2X7 with the antagonist GSK1482160A was found to increase the phagocytic capacity of microglia [24].

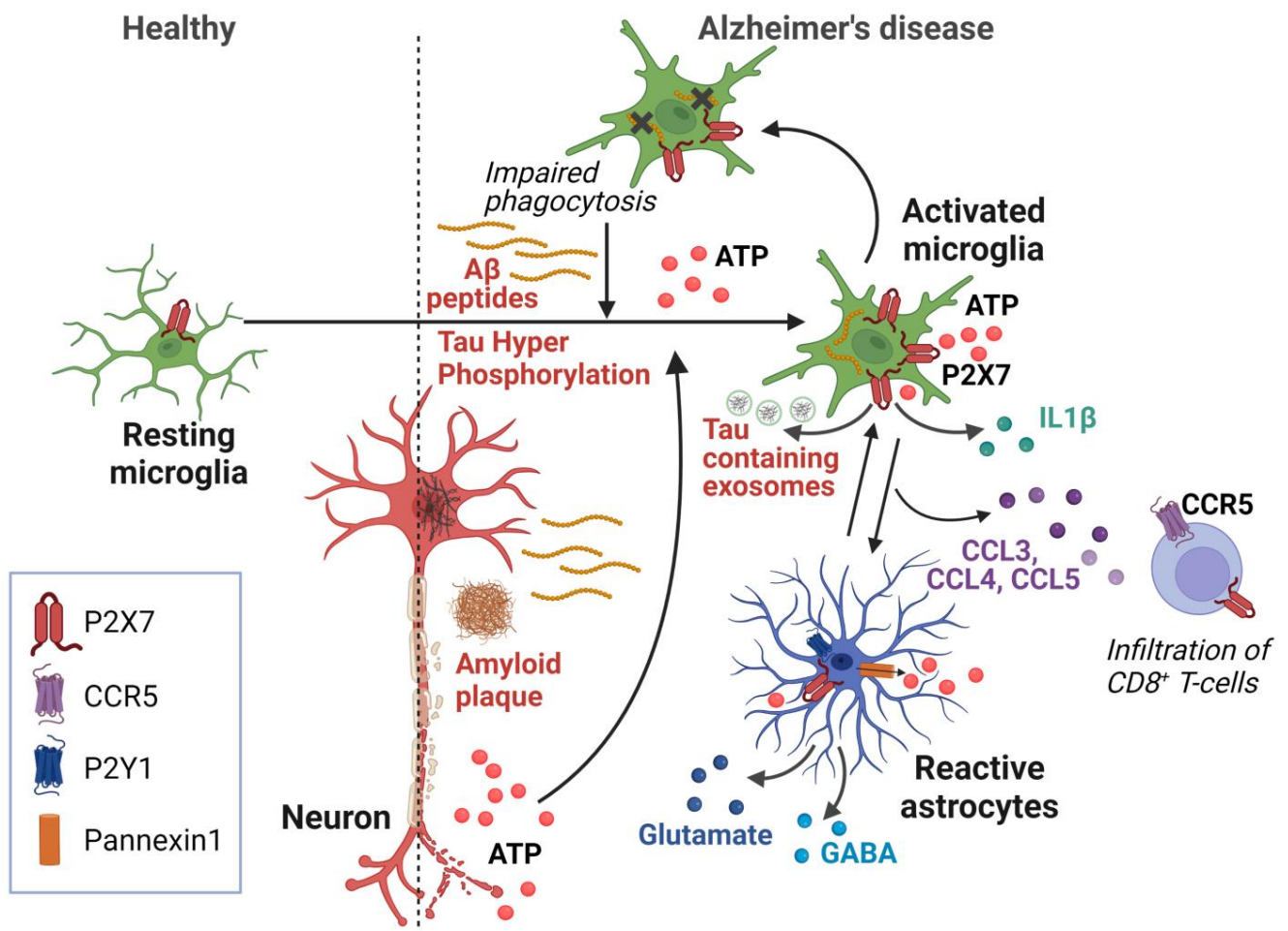


Figure 1. Schematic representation of P2X7-dependent mechanisms involved in Alzheimer's disease. In this model, increased levels of A β peptide induce ATP release from microglia and astrocytes, as well as from damaged neurons. This ATP release is amplified by astrocytes via purinergic receptors and ATP release via Pannexin 1. P2X7 on microglia and astrocytes senses high ATP levels and initiates neurodegenerative processes via the production of IL-1 β and CCL3, CCL4, and CCL5 chemokines, leading to impaired neuronal function and the recruitment of pathogenic CD8⁺ T lymphocytes. Activation of P2X7 also induces the secretion of Tau-containing exosomes from microglia, contributing to Tau pathology. The presence of high amount of ATP inhibits P2X7-mediated phagocytosis, further increasing the accumulation of A β peptides. Created with BioRender.com.

Table 2. Key roles of P2X7 in the immunopathology of AD.

Role	Cells Involved	References
A β phagocytosis	Microglia	[16,24,69]
Release of Tau containing exosomes	Microglia	[45]
Release of IL1 β	Microglia	[24,44,49,51]
Release of chemokines	Microglia	[20,23,59]
Release of chemokines	Astrocyte	[20,23,58]
Release of glutamate and GABA	Astrocyte	[70–72]

Under pathological conditions, in the presence of a high extracellular ATP concentration, the P2X7 function shifts from phagocytosis to the release of inflammatory mediators. In AD, we hypothesize that, partly due to aging, microglia become overwhelmed and are unable to be properly activated for the phagocytosis of extracellular aggregates. Instead, they release pro-inflammatory cytokines and chemokines that contribute to pathological processes, forming a vicious cycle [52,53]. Therefore, inhibiting P2X7 could regulate the polarization of microglia, shifting them from a pro-inflammatory state characterized by the production of cytokines and chemokines towards a state that promotes the phagocytosis of aggregates of A β peptides and abnormal extracellular hyperphosphorylated Tau proteins (Figure 1).

3.9. P2X7 and Astrocytes

In AD, astrocytes undergo changes that reduce their support for synapses and exhibit impairments in the endolysosomal pathway responsible for protein clearance [70]. P2X7 inhibition did not result in any observed changes in the morphology of astrocytes in AD mouse models [20,23,24,44], but further phenotyping of the heterogeneous activated astrocyte population is required to investigate this in depth. Still, several lines of evidence suggest that P2X7 expressed by astrocytes could potentially be involved in pathological processes during AD [70]. First, the P2X7 protein was detected in astrocytes within the brains of AD patients, particularly in the vicinity of amyloid plaques, and also in the brains of patients with frontotemporal lobar degeneration and Pick's disease [20,23,24]. Further, when astrocytes are stimulated with ATP or Bz-ATP, the release of CCL3 was only observed in cells of wild-type mice but not of P2X7-deficient mice [20]. As discussed above, the genetic deletion of P2X7 in mouse models of AD and tauopathy has shown positive effects on cognitive functions compared to wild-type mice. Upon stimulation of hippocampal brain slices with the agonist Bz-ATP, the release of both glutamate and/or GABA was observed [71], yet this effect was found to be associated with the presence of P2X7 specifically in astrocytes rather than neurons, indicating their potential involvement in the excitotoxic effects of glutamate and neuronal inhibition in AD [72,73] (Figure 1 and Table 2). Further research is needed to fully understand the potential role of P2X7 expressed by astrocytes in the context of AD.

3.10. P2X7 as a Therapeutic Target

Inhibiting P2X7 is a promising avenue for the development of therapeutic interventions for AD [74]. As discussed above, P2X7 is upregulated during AD, and in many models, inhibiting or knocking out P2X7 ameliorates the P2X7-driven inflammation and rescues critical AD-related deficits. In the central nervous system, P2X7 is the most abundant on glial cells, especially microglia [65], and current evidence suggests these are the most important cells underlying pathological P2X7 functions, so it is assumed that the effects of P2X7 inhibitors will largely be mediated by inhibiting microglial P2X7 [66]. However, these effects need to be more thoroughly elucidated with a cell-specific inhibition of P2X7 and will undoubtedly be the subject of future studies.

Previously, although these therapies did not reach clinical availability, P2X7 antagonists have been investigated as a treatment for rheumatoid arthritis [75,76] and, more promisingly, Crohn's disease [77], which found the P2X7 inhibitors to be safe and well tolerated. The development of P2X7-targeting therapies for AD can build upon these foundations. The low sensitivity of P2X7 makes it a particularly attractive pharmacological target because its lack of response in physiologically normal extracellular ATP levels suggests that inhibiting P2X7 should only have an effect when extracellular ATP levels spike to pathological levels [66]. Pharmacological antagonists are one potential tool for inhibiting P2X7 in disease. Initially, BBG was considered a potential therapy targeting P2X7, but it has largely been abandoned as a therapeutic option due to its also inhibiting voltage-gated sodium channels [78,79]. More recently, other more specific compounds with excellent blood–brain barrier (BBB) permeability have been developed [17,80,81]. However, they have not yet been the focus of clinical trials.

Another tool that could be used to inhibit pathological P2X7 is blocking antibodies, particularly nanobodies. In fact, there are nanobodies currently under development and validation [82]. Although their potential use in AD remains unexplored, there are particularly promising pre-clinical effects in a mouse model of stroke, another neurological disorder in which increased extracellular ATP acts as a critical danger signal and where microglial P2X7 plays an important pathological role [83]. Unlike BBB-permeable inhibitors, one limitation of nanobodies is that the delivery method may be more invasive because nanobodies do not as readily pass the BBB. However, nanobody-encoding AAVs are a promising strategy to more stably express nanobodies in the brain, thus requiring fewer injections while more specifically targeting the brain [82].

4. Conclusions

The investigation of P2X7 in a pathological context remains a complex area of study, primarily due to its diverse functions, which depend not only on the expressing cells but also on the surrounding environmental conditions that can modulate its activation state. Despite this complexity, many studies *in vivo*, *in vitro*, and in patients all suggest that P2X7 activation plays a role in several pathological processes in AD, including the formation of lesions, cognitive impairments, and the accompanying inflammatory response. Notably, the pro-inflammatory function of P2X7, attributed largely to its levels in microglial cells, is well established and is a promising avenue for the development of therapeutics. However, the direct or indirect contribution of astrocytes and other cells to the P2X7-mediated processes needs to be further explored. Promisingly, numerous pharmacological and biological inhibitors, such as P2X7-blocking antibodies, are currently under development and validation [82,83]. As our ability to detect and diagnose AD at earlier stages improves, the incorporation of P2X7-targeting therapies has the potential to dramatically improve the treatment of AD.

Author Contributions: Writing—original draft, K.E.R. and C.D.; writing—review and editing, K.E.R., P.-A.D.-M., Y.C., X.G., F.S. and C.D.; funding acquisition, X.G., F.S. and C.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Sorbonne University; Agence Nationale pour la Recherche (ANR); Programme Investissements d'Avenir IHU FOReSIGHT, grant number ANR-18-IAHU-0001; Union Nationale des Aveugles et Déficient Visuels (UNADEV); and Retina France. The APC was funded by Union Nationale des Aveugles et Déficient Visuels (UNADEV).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: The work described in this article was supported by the COST Action CA21130 “P2X receptors as a therapeutic opportunity (PRESTO)”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. McCarthy, A.E.; Yoshioka, C.; Mansoor, S.E. Full-Length P2X7 Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell* **2019**, *179*, 659–670.e13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Miras-Portugal, M.T.; Ortega, F.; Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J.; Pérez-Sen, R.; Delicado, E.G. P2X7 Receptors in the Central Nervous System. *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *187*, 114472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gallucci, S.; Matzinger, P. Danger Signals: SOS to the Immune System. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 114–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Leeson, H.C.; Kasherman, M.A.; Chan-Ling, T.; Lovelace, M.D.; Brownlie, J.C.; Toppinen, K.M.; Gu, B.J.; Weible, M.W., II. P2X7 Receptors Regulate Phagocytosis and Proliferation in Adult Hippocampal and SVZ Neural Progenitor Cells: Implications for Inflammation in Neurogenesis. *Stem Cells* **2018**, *36*, 1764–1777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Solle, M.; Labasi, J.; Perregaux, D.G.; Stam, E.; Petrushova, N.; Koller, B.H.; Griffiths, R.J.; Gabel, C.A. Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 125–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wiley, J.S.; Sluyter, R.; Gu, B.J.; Stokes, L.; Fuller, S.J. The Human P2X7 Receptor and Its Role in Innate Immunity. *Tissue Antigens* **2011**, *78*, 321–332. [[CrossRef](#)]
7. Ferrari, D.; Pizzirani, C.; Adinolfi, E.; Lemoli, R.M.; Curti, A.; Idzko, M.; Panther, E.; Di Virgilio, F. The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 3877–3883. [[CrossRef](#)]
8. Kanellopoulos, J.M.; Delarasse, C. Pleiotropic Roles of P2X7 in the Central Nervous System. *Front. Cell Neurosci.* **2019**, *13*, 401. [[CrossRef](#)]
9. Suzuki, T.; Hide, I.; Ido, K.; Kohsaka, S.; Inoue, K.; Nakata, Y. Production and Release of Neuroprotective Tumor Necrosis Factor by P2X7 Receptor-Activated Microglia. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 1–7. [[CrossRef](#)]
10. Solini, A.; Chiozzi, P.; Morelli, A.; Fellin, R.; Di Virgilio, F. Human Primary Fibroblasts in Vitro Express a Purinergic P2X7 Receptor Coupled to Ion Fluxes, Microvesicle Formation and IL-6 Release. *J. Cell Sci.* **1999**, *112 Pt 3*, 297–305. [[CrossRef](#)]
11. Shieh, C.-H.; Heinrich, A.; Serchov, T.; van Calker, D.; Biber, K. P2X7-Dependent, but Differentially Regulated Release of IL-6, CCL2, and TNF- α in Cultured Mouse Microglia. *Glia* **2014**, *62*, 592–607. [[CrossRef](#)]
12. Heinrich, A.; Andó, R.D.; Túri, G.; Rózsa, B.; Sperlách, B. K⁺ Depolarization Evokes ATP, Adenosine and Glutamate Release from Glia in Rat Hippocampus: A Microelectrode Biosensor Study. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1003–1020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Papp, L.; Vizi, E.S.; Sperlách, B. Lack of ATP-Evoked GABA and Glutamate Release in the Hippocampus of P2X7 Receptor-/- Mice. *Neuroreport* **2004**, *15*, 2387–2391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Parvathenani, L.K.; Tertyshnikova, S.; Greco, C.R.; Roberts, S.B.; Robertson, B.; Posmantur, R. P2X7 Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-Regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13309–13317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lee, H.G.; Won, S.M.; Gwag, B.J.; Lee, Y.B. Microglial P2X₇ Receptor Expression Is Accompanied by Neuronal Damage in the Cerebral Cortex of the APP^{swE}/PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Exp. Mol. Med.* **2011**, *43*, 7–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gu, B.J.; Wiley, J.S. P2X7 as a Scavenger Receptor for Innate Phagocytosis in the Brain. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 4195–4208. [[CrossRef](#)]
17. Illes, P. P2X7 Receptors Amplify CNS Damage in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5996. [[CrossRef](#)]
18. Mattson, M.P. Cellular Actions of Beta-Amyloid Precursor Protein and Its Soluble and Fibrillogenic Derivatives. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 1081–1132. [[CrossRef](#)]
19. Duyckaerts, C.; Bennefib, M.; Grignon, Y.; Uchihara, T.; He, Y.; Piette, F.; Hauw, J.J. Modeling the Relation between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status. *Neurobiol. Aging* **1997**, *18*, 267–273. [[CrossRef](#)]
20. Martin, E.; Amar, M.; Dalle, C.; Youssef, I.; Boucher, C.; Le Duigou, C.; Brückner, M.; Prigent, A.; Sazdovitch, V.; Halle, A.; et al. New Role of P2X7 Receptor in an Alzheimer’s Disease Mouse Model. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 108–125. [[CrossRef](#)]
21. Martínez-Frailes, C.; Di Lauro, C.; Bianchi, C.; de Diego-García, L.; Sebastián-Serrano, Á.; Boscá, L.; Díaz-Hernández, M. Amyloid Peptide Induced Neuroinflammation Increases the P2X7 Receptor Expression in Microglial Cells, Impacting on Its Functionality. *Front. Cell Neurosci.* **2019**, *13*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. McLarnon, J.G.; Ryu, J.K.; Walker, D.G.; Choi, H.B. Upregulated Expression of Purinergic P2X(7) Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid-Beta Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 1090–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Carvalho, K.; Martin, E.; Ces, A.; Sarrazin, N.; Lagouge-Roussey, P.; Nous, C.; Boucherit, L.; Youssef, I.; Prigent, A.; Faivre, E.; et al. P2X7-Deficiency Improves Plasticity and Cognitive Abilities in a Mouse Model of Tauopathy. *Prog. Neurobiol.* **2021**, *206*, 102139. [[CrossRef](#)]

24. Di Lauro, C.; Bianchi, C.; Sebastián-Serrano, Á.; Soria-Tobar, L.; Alvarez-Castelao, B.; Nicke, A.; Díaz-Hernández, M. P2X7 Receptor Blockade Reduces Tau Induced Toxicity, Therapeutic Implications in Tauopathies. *Prog. Neurobiol.* **2022**, *208*, 102173. [[CrossRef](#)]
25. Jin, H.; Han, J.; Resing, D.; Liu, H.; Yue, X.; Miller, R.L.; Schoch, K.M.; Miller, T.M.; Perlmutter, J.S.; Egan, T.M.; et al. Synthesis and in Vitro Characterization of a P2X7 Radioligand [123I]TZ6019 and Its Response to Neuroinflammation in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *820*, 8–17. [[CrossRef](#)]
26. Li, Y.; Laws, S.M.; Miles, L.A.; Wiley, J.S.; Huang, X.; Masters, C.L.; Gu, B.J. Genomics of Alzheimer's Disease Implicates the Innate and Adaptive Immune Systems. *Cell Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 7397–7426. [[CrossRef](#)]
27. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gu, B.J.; Sluyter, R.; Skarratt, K.K.; Shemon, A.N.; Dao-Ung, L.-P.; Fuller, S.J.; Barden, J.A.; Clarke, A.L.; Petrou, S.; Wiley, J.S. An Arg307 to Gln Polymorphism within the ATP-Binding Site Causes Loss of Function of the Human P2X7 Receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31287–31295. [[CrossRef](#)]
29. Wiley, J.S.; Dao-Ung, L.-P.; Li, C.; Shemon, A.N.; Gu, B.J.; Smart, M.L.; Fuller, S.J.; Barden, J.A.; Petrou, S.; Sluyter, R. An Ile-568 to Asn Polymorphism Prevents Normal Trafficking and Function of the Human P2X7 Receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17108–17113. [[CrossRef](#)]
30. Stokes, L.; Fuller, S.J.; Sluyter, R.; Skarratt, K.K.; Gu, B.J.; Wiley, J.S. Two Haplotypes of the P2X(7) Receptor Containing the Ala-348 to Thr Polymorphism Exhibit a Gain-of-Function Effect and Enhanced Interleukin-1beta Secretion. *FASEB J.* **2010**, *24*, 2916–2927. [[CrossRef](#)]
31. Gu, B.J.; Field, J.; Dutertre, S.; Ou, A.; Kilpatrick, T.J.; Lechner-Scott, J.; Scott, R.; Lea, R.; Taylor, B.V.; Stankovich, J.; et al. A Rare P2X7 Variant Arg307Gln with Absent Pore Formation Function Protects against Neuroinflammation in Multiple Sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 5644–5654. [[CrossRef](#)]
32. Gu, B.J.; Zhang, W.; Worthington, R.A.; Sluyter, R.; Dao-Ung, P.; Petrou, S.; Barden, J.A.; Wiley, J.S. A Glu-496 to Ala Polymorphism Leads to Loss of Function of the Human P2X7 Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11135–11142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cabrini, G.; Falzoni, S.; Forchap, S.L.; Pellegatti, P.; Balboni, A.; Agostini, P.; Cuneo, A.; Castoldi, G.; Baricordi, O.R.; Di Virgilio, F. A His-155 to Tyr Polymorphism Confers Gain-of-Function to the Human P2X7 Receptor of Human Leukemic Lymphocytes. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 82–89. [[CrossRef](#)]
34. Boldt, W.; Klapperstück, M.; Büttner, C.; Sadtler, S.; Schmalzing, G.; Markwardt, F. Glu496Ala Polymorphism of Human P2X7 Receptor Does Not Affect Its Electrophysiological Phenotype. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *284*, C749–C756. [[CrossRef](#)]
35. Wiley, J.S.; Dao-Ung, L.P.; Gu, B.J.; Sluyter, R.; Shemon, A.N.; Li, C.; Taper, J.; Gallo, J.; Manoharan, A. A Loss-of-Function Polymorphic Mutation in the Cytolytic P2X7 Receptor Gene and Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Molecular Study. *Lancet* **2002**, *359*, 1114–1119. [[CrossRef](#)]
36. Li, C.M.; Campbell, S.J.; Kumararatne, D.S.; Bellamy, R.; Ruwende, C.; McAdam, K.P.W.J.; Hill, A.V.S.; Lammas, D.A. Association of a Polymorphism in the P2X7 Gene with Tuberculosis in a Gambian Population. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1458–1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sanz, J.M.; Falzoni, S.; Rizzo, R.; Cipollone, F.; Zuliani, G.; Di Virgilio, F. Possible Protective Role of the 489C>T P2X7R Polymorphism in Alzheimer's Disease. *Exp. Gerontol.* **2014**, *60*, 117–119. [[CrossRef](#)]
38. Gu, B.J.; Baird, P.N.; Vessey, K.A.; Skarratt, K.K.; Fletcher, E.L.; Fuller, S.J.; Richardson, A.J.; Guymer, R.H.; Wiley, J.S. 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 J.* **2013**, *27*, 1479–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Li, Y.; Huang, X.; Fowler, C.; Lim, Y.Y.; Laws, S.M.; Faux, N.; Doecke, J.D.; Trounson, B.; Pertile, K.; Rumble, R.; et al. Identification of Leukocyte Surface P2X7 as a Biomarker Associated with Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7867. [[CrossRef](#)]
40. Sanz, J.M.; Falzoni, S.; Morieri, M.L.; Passaro, A.; Zuliani, G.; Di Virgilio, F. Association of Hypomorphic P2X7 Receptor Genotype With Age. *Front. Mol. Neurosci.* **2020**, *13*, 8. [[CrossRef](#)]
41. Delarasse, C.; Auger, R.; Gonnord, P.; Fontaine, B.; Kanellopoulos, J.M. The Purinergic Receptor P2X7 Triggers Alpha-Secretase-Dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 2596–2606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Darmellah, A.; Rayah, A.; Auger, R.; Cuif, M.-H.; Prigent, M.; Arpin, M.; Alcover, A.; Delarasse, C.; Kanellopoulos, J.M. Ezrin/Radixin/Moesin Are Required for the Purinergic P2X7 Receptor (P2X7R)-Dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 34583–34595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. León-Otegui, M.; Gómez-Villafuertes, R.; Díaz-Hernández, J.I.; Díaz-Hernández, M.; Miras-Portugal, M.T.; Gualix, J. Opposite Effects of P2X7 and P2Y2 Nucleotide Receptors on α -Secretase-Dependent APP Processing in Neuro-2a Cells. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2255–2262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Diaz-Hernandez, J.I.; Gomez-Villafuertes, R.; León-Otegui, M.; Hontecillas-Prieto, L.; Del Puerto, A.; Trejo, J.L.; Lucas, J.J.; Garrido, J.J.; Gualix, J.; Miras-Portugal, M.T.; et al. In Vivo P2X7 Inhibition Reduces Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease through GSK3 β and Secretases. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1816–1828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ruan, Z.; Delpech, J.-C.; Venkatesan Kalavai, S.; Van Enoo, A.A.; Hu, J.; Ikezu, S.; Ikezu, T. P2RX7 Inhibitor Suppresses Exosome Secretion and Disease Phenotype in P301S Tau Transgenic Mice. *Mol. Neurodegener.* **2020**, *15*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Bianchi, C.; Alvarez-Castelao, B.; Sebastián-Serrano, Á.; Di Lauro, C.; Soria-Tobar, L.; Nicke, A.; Engel, T.; Díaz-Hernández, M. P2X7 Receptor Inhibition Ameliorates Ubiquitin-Proteasome System Dysfunction Associated with Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res. Ther.* **2023**, *15*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Halle, A.; Hornung, V.; Petzold, G.C.; Stewart, C.R.; Monks, B.G.; Reinheckel, T.; Fitzgerald, K.A.; Latz, E.; Moore, K.J.; Golenbock, D.T. The NALP3 Inflammasome Is Involved in the Innate Immune Response to Amyloid-Beta. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 857–865. [[CrossRef](#)]
48. Heneka, M.T.; Kummer, M.P.; Stutz, A.; Delekate, A.; Schwartz, S.; Vieira-Saecker, A.; Griep, A.; Axt, D.; Remus, A.; Tzeng, T.-C.; et al. NLRP3 Is Activated in Alzheimer's Disease and Contributes to Pathology in APP/PS1 Mice. *Nature* **2013**, *493*, 674–678. [[CrossRef](#)]
49. Rampe, D.; Wang, L.; Ringheim, G.E. P2X7 Receptor Modulation of Beta-Amyloid- and LPS-Induced Cytokine Secretion from Human Macrophages and Microglia. *J. Neuroimmunol.* **2004**, *147*, 56–61. [[CrossRef](#)]
50. Hu, S.J.; Calippe, B.; Lavalette, S.; Roubeix, C.; Montassar, F.; Housset, M.; Levy, O.; Delarasse, C.; Paques, M.; Sahel, J.-A.; et al. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-Deficient Mononuclear Phagocytes Leads to Increased Interleukin-1 β Secretion and Photoreceptor Neurodegeneration. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 6987–6996. [[CrossRef](#)]
51. Sanz, J.M.; Chiozzi, P.; Ferrari, D.; Colaianna, M.; Idzko, M.; Falzoni, S.; Fellin, R.; Trabace, L.; Di Virgilio, F. Activation of Microglia by Amyloid β Requires P2X7 Receptor Expression. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4378–4385. [[CrossRef](#)]
52. Martin, E.; Delarasse, C. Complex Role of Chemokine Mediators in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Biomed. J.* **2018**, *41*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Martin, E.; Boucher, C.; Fontaine, B.; Delarasse, C. Distinct Inflammatory Phenotypes of Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Alzheimer's Disease Models: Effects of Aging and Amyloid Pathology. *Aging Cell* **2017**, *16*, 27–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Laurent, C.; Dorothée, G.; Hunot, S.; Martin, E.; Monnet, Y.; Duchamp, M.; Dong, Y.; Légeron, F.-P.; Leboucher, A.; Burnouf, S.; et al. Hippocampal T Cell Infiltration Promotes Neuroinflammation and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Brain* **2017**, *140*, 184–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Xia, M.Q.; Qin, S.X.; Wu, L.J.; Mackay, C.R.; Hyman, B.T. Immunohistochemical Study of the Beta-Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 and Their Ligands in Normal and Alzheimer's Disease Brains. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 31–37. [[CrossRef](#)]
56. Passos, G.F.; Figueiredo, C.P.; Prediger, R.D.S.; Pandolfo, P.; Duarte, F.S.; Medeiros, R.; Calixto, J.B. Role of the Macrophage Inflammatory Protein-1 α /CC Chemokine Receptor 5 Signaling Pathway in the Neuroinflammatory Response and Cognitive Deficits Induced by Beta-Amyloid Peptide. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 1586–1597. [[CrossRef](#)]
57. Marciniak, E.; Faivre, E.; Dutar, P.; Alves Pires, C.; Demeyer, D.; Caillierez, R.; Laloux, C.; Buée, L.; Blum, D.; Humez, S. The Chemokine MIP-1 α /CCL3 Impairs Mouse Hippocampal Synaptic Transmission, Plasticity and Memory. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15862. [[CrossRef](#)]
58. Panenka, W.; Jijon, H.; Herx, L.M.; Armstrong, J.N.; Feighan, D.; Wei, T.; Yong, V.W.; Ransohoff, R.M.; MacVicar, B.A. P2X7-like Receptor Activation in Astrocytes Increases Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression via Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 7135–7142. [[CrossRef](#)]
59. Kataoka, A.; Tozaki-Saitoh, H.; Koga, Y.; Tsuda, M.; Inoue, K. Activation of P2X7 Receptors Induces CCL3 Production in Microglial Cells through Transcription Factor NFAT. *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 115–125. [[CrossRef](#)]
60. Man, S.-M.; Ma, Y.-R.; Shang, D.-S.; Zhao, W.-D.; Li, B.; Guo, D.-W.; Fang, W.-G.; Zhu, L.; Chen, Y.-H. Peripheral T Cells Overexpress MIP-1 α to Enhance Its Transendothelial Migration in Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* **2007**, *28*, 485–496. [[CrossRef](#)]
61. Miras-Portugal, M.T.; Sebastián-Serrano, Á.; de Diego García, L.; Díaz-Hernández, M. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 7063–7072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Illes, P.; Khan, T.M.; Rubini, P. Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 7049–7062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Metzger, M.W.; Walser, S.M.; Aprile-Garcia, F.; Dedic, N.; Chen, A.; Holsboer, F.; Arzt, E.; Wurst, W.; Deussing, J.M. Genetically Dissecting P2rx7 Expression within the Central Nervous System Using Conditional Humanized Mice. *Purinergic Signal* **2017**, *13*, 153–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kaczmarek-Hajek, K.; Zhang, J.; Kopp, R.; Grosche, A.; Rissiek, B.; Saul, A.; Bruzzone, S.; Engel, T.; Jooss, T.; Krautloher, A.; et al. Re-Evaluation of Neuronal P2X7 Expression Using Novel Mouse Models and a P2X7-Specific Nanobody. *eLife* **2018**, *7*, e36217. [[CrossRef](#)]
65. Weisman, G.A.; Camden, J.M.; Peterson, T.S.; Ajit, D.V.; Woods, L.T.; Erb, L. P2 Receptors for Extracellular Nucleotides in the Central Nervous System: Role of P2X7 and P2Y2 Receptor Interactions in Neuroinflammation. *Mol. Neurobiol.* **2012**, *46*, 96–113. [[CrossRef](#)]
66. Illes, P.; Rubini, P.; Huang, L.; Tang, Y. The P2X7 Receptor: A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **2019**, *23*, 165–176. [[CrossRef](#)]
67. Gu, B.J.; Saunders, B.M.; Petrou, S.; Wiley, J.S. P2X(7) Is a Scavenger Receptor for Apoptotic Cells in the Absence of Its Ligand, Extracellular ATP. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 2365–2375. [[CrossRef](#)]
68. Gu, B.J.; Saunders, B.M.; Jursik, C.; Wiley, J.S. The P2X7-Nonmuscle Myosin Membrane Complex Regulates Phagocytosis of Nonopsonized Particles and Bacteria by a Pathway Attenuated by Extracellular ATP. *Blood* **2010**, *115*, 1621–1631. [[CrossRef](#)]

69. Ni, J.; Wang, P.; Zhang, J.; Chen, W.; Gu, L. Silencing of the P2X(7) Receptor Enhances Amyloid- β Phagocytosis by Microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *434*, 363–369. [[CrossRef](#)]
70. Beltran-Lobo, P.; Reid, M.J.; Jimenez-Sanchez, M.; Verkhatsky, A.; Perez-Nievas, B.G.; Noble, W. Astrocyte Adaptation in Alzheimer's Disease: A Focus on Astrocytic P2X7R. *Essays Biochem.* **2023**, *67*, 119–130. [[CrossRef](#)]
71. Sperlágh, B.; Köfalvi, A.; Deuchars, J.; Atkinson, L.; Milligan, C.J.; Buckley, N.J.; Vizi, E.S. Involvement of P2X7 Receptors in the Regulation of Neurotransmitter Release in the Rat Hippocampus. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 1196–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Fellin, T.; Pozzan, T.; Carmignoto, G. Purinergic Receptors Mediate Two Distinct Glutamate Release Pathways in Hippocampal Astrocytes. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 4274–4284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Khan, M.T.; Deussing, J.; Tang, Y.; Illes, P. Astrocytic Rather than Neuronal P2X7 Receptors Modulate the Function of the Tri-Synaptic Network in the Rodent Hippocampus. *Brain Res. Bull.* **2019**, *151*, 164–173. [[CrossRef](#)]
74. Francistiová, L.; Bianchi, C.; Di Lauro, C.; Sebastián-Serrano, Á.; de Diego-García, L.; Kobolák, J.; Dinnyés, A.; Díaz-Hernández, M. The Role of P2X7 Receptor in Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* **2020**, *13*, 94. [[CrossRef](#)]
75. Keystone, E.C.; Wang, M.M.; Layton, M.; Hollis, S.; McInnes, I.B.; on behalf of the D1520C00001 Study Team. 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. *Ann. Rheum. Dis.* **2012**, *71*, 1630–1635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Stock, T.C.; Bloom, B.J.; Wei, N.; Ishaq, S.; Park, W.; Wang, X.; Gupta, P.; Mebus, C.A. Efficacy and Safety of CE-224,535, an Antagonist of P2X7 Receptor, in Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis Inadequately Controlled by Methotrexate. *J. Rheumatol.* **2012**, *39*, 720–727. [[CrossRef](#)]
77. Eser, A.; Colombel, J.-F.; Rutgeerts, P.; Vermeire, S.; Vogelsang, H.; Braddock, M.; Persson, T.; Reinisch, W. 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. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 2247–2253. [[CrossRef](#)]
78. Jiang, L.-H.; Mackenzie, A.B.; North, R.A.; Surprenant, A. Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 82–88. [[CrossRef](#)]
79. Jo, S.; Bean, B.P. Inhibition of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by Brilliant Blue G. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 247–257. [[CrossRef](#)]
80. Lee, S.; Ha, H.; Jang, J.; Byun, Y. Recent Advances in the Development of Antidepressants Targeting the Purinergic P2X7 Receptor. *Curr. Med. Chem.* **2023**, *30*, 164–177. [[CrossRef](#)]
81. Territo, P.R.; Zarrinmayeh, H. P2X7 Receptors in Neurodegeneration: Potential Therapeutic Applications From Basic to Clinical Approaches. *Front. Cell Neurosci.* **2021**, *15*, 617036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wilmes, M.; Pinto Espinoza, C.; Ludewig, P.; Stabernack, J.; Liesz, A.; Nicke, A.; Gelderblom, M.; Gerloff, C.; Falzoni, S.; Tolosa, E.; et al. Blocking P2X7 by Intracerebroventricular Injection of P2X7-Specific Nanobodies Reduces Stroke Lesions. *J. Neuroinflamm.* **2022**, *19*, 256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.