

UNIVERSITE PARIS 13
U.F.R. LEONARD DE VINCI
SANTÉ-MÉDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE DE SCIENCE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Stéphane SAINT GEORGES

Le 4 Décembre 2013

Titre :

**Leucémie lymphoïde chronique et microenvironnement :
Stimulation du récepteur B à l'antigène et régulation de l'expression
membranaire du CXCR4 par les protéines kinases D**

Directeur de thèse : Pr. Dominique LEDOUX
Co-directrice de thèse : Dr. Christine LE ROY

JURY

Pr. Olivier OUDAR, Président
Pr. Ali DALLOUL, Rapporteur
Dr. Emmanuel DONNADIEU, Rapporteur
Dr. Axel PERIANIN, Examineur
Dr. Christine LE ROY, Co-directrice
Pr. Dominique LEDOUX, Directeur

Remerciements

Je remercie d'une manière générale, sans distinction, toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant ces 4 années de Doctorat, mais également tous ceux qui ont été à mes côtés depuis le début de ma formation universitaire réalisée entièrement à l'UFR SMBH de l'université Paris XIII.

Je remercie pour la qualité et la rigueur de leur enseignement en biologie Mr le Pr. Olivier Oudar, Mr le Dr. Dominique Briane, Mme le Pr. Natacha Bessis, Mr le Pr. Didier Lutomski, Mr le Pr. Remi Fagard et surtout Mr le Pr. Dominique Ledoux (mon mentor). Sans le savoir, et de manière non anodine, ils ont contribué à attiser ma curiosité et à me donner l'envie de poursuivre mon cursus universitaire jusqu'au Doctorat.

Parmi les personnes qui ont accompagné ma formation scientifique figure en tête de liste Mr le Pr. Dominique Ledoux. Il a été l'encadrant de mon stage de Master 2 et le directeur de ma thèse de Doctorat. Durant ces 5 ans de collaboration, il m'a transmis sa confiance, sa motivation, sa sincérité, sa rigueur, ses connaissances et surtout son excellente qualité scientifique qui m'ont aidé à gérer au mieux mon projet de thèse. Je lui adresse mes sincères remerciements.

La deuxième personne qui a suivi de près ma formation scientifique est la co-directrice de ma thèse de Doctorat, Mme le Dr. Christine Le Roy. J'ai bénéficié de son aide précieuse dans nos discussions scientifiques avec Dominique Ledoux, dans le suivi de mes expérimentations et dans la correction de mes présentations écrites et orales. Je la remercie profondément pour sa disponibilité et la félicite pour le travail énorme qu'elle réalise au sein du laboratoire.

Je remercie chaleureusement ma collaboratrice et amie Maude Quettier. Son aide m'a été précieuse lors de nos interactions dans le cadre de mon projet de thèse. Je la remercie pour sa bonne humeur, sa gentillesse, sa disponibilité, sa motivation et son enthousiasme.

Je remercie profondément les membres du jury :

- les rapporteurs, Mr le Pr. Ali Dalloul et Mr le Dr. Emmanuel Donnadiou d'avoir accepté cette lourde tâche,
- l'examineur, Mr le Dr. Axel Perianin d'avoir également accepté ce travail de lecture,
- le président du jury, Mr. le Pr. Olivier Oudar,
- et bien sûr Mr. le Pr. Dominique Ledoux et Mme le Dr. Christine Le Roy.

Je remercie le groupe de travail « LLC » dans lequel je cite d'abord les hématologues Mme le Pr. Florence Cymbalista et Mr le Pr. Vincent Levy. Mon travail de thèse a entièrement été réalisé à partir d'échantillons sanguins issus de patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) obtenus grâce à leur collaboration précieuse. Je remercie dans ce même cadre Annie et Fabienne qui très gentiment nous prévenait de la possibilité de venir récupérer ces échantillons à l'hôpital Avicenne.

Je remercie encore Florence Cymbalista pour sa présence lors de mes présentations scientifiques du vendredi, pour ses conseils et pour son expertise dans la LLC dont nous avons très largement bénéficié.

Toujours dans le groupe LLC, je remercie Christine, Maude, Stéphanie, Arsène, Hervé, Bela et Laura pour nos réunions très utiles du lundi et notre organisation collective pour la purification et la congélation des cellules de LLC, le mardi ou le mercredi après-midi.

D'une manière générale je remercie vivement tous les membres du laboratoire « Adaptateurs de signalisation en hématologie (ASIH) ; UMR U978/Inserm ; Université Paris XIII ».

Ce laboratoire a été créé en 2009, au début de ma thèse, grâce notamment à la volonté et à la détermination de sa directrice, Mme le Dr. Nadine Varin-Blank. Nadine est une directrice de laboratoire exceptionnelle qui a la faculté de se mettre dans la peau d'un stagiaire de M2, d'un doctorant, d'un post-doc, d'un chercheur, d'un enseignant et d'un médecin à la fois. Elle se rend toujours disponible pour aider chacun à avancer dans ses différents projets. Je lui adresse mon profond respect.

Merci à tous les chercheurs du laboratoire pour leur encadrement et notamment Christine, Olivier, Laura G, Laura V, Betty, Lionel et Fanny pour m'avoir fait bénéficier de leur expertise expérimentale et scientifique. Merci également aux techniciens des laboratoires d'anatomo-pathologie, d'hématologie biologique et de biochimie de l'hôpital Avicenne.

Merci à mon « potus » Mohand-Akli Boukhiar, à ma « louloute » Vanessa Laurienté, à ma chère amie Lyra Razanadrakoto et à ma chère Claude Cymbalista (ma deuxième maman). Leur bonne humeur au quotidien a été un plus non négligeable.

Mon travail de thèse a bénéficié séquentiellement de trois sources de financement :

- la bourse MENRT (3ans) octroyée par l'école doctorale de l'université Paris XIII que je remercie vivement,
- un financement de fin de thèse (6mois) alloué par la société française d'hématologie que je remercie également,
- et un financement de deux mois attribué par l'association THEOREM que je remercie également.

Je remercie mes anciens camarades de fac (notamment les banguistes) avec qui j'ai gardé le contact et tous mes amis sans distinction. Ils ont toujours cherché à savoir comment avançaient mes recherches et cela a constitué une source de motivation supplémentaire.

Enfin, je dédie entièrement ce travail à ma famille :

À mes frères Mackson, Agnel, Aubert et Iréné pour leur soutien inconditionnel et la solidarité qui caractérise la solidité de notre fratrie si chère à nos yeux,

À mes chères belles sœurs Yveline et Félanda,

À mes cousins Anderson, Claudine et Milor,

Je dédie également ce travail :

À mes amis proches Walter, Sauveline, David, Yvela, Mardoché, Joselaine, Yvelt, Wilbert et Rosemène,

Et à la nouvelle génération, mes neveux Kayvann et Mayverick, mes filleuls Shana, Emilie, Frémyo, Wistley et mes amis Marléyan et Jason.

Je dédie particulièrement ce travail à ma chère mère Mme Mélina Joseph qui m'accompagne par la pensée depuis le début. A chaque fois que je lui faisais savoir que j'avais validé un semestre, elle me répondait « merci mon garçon » tout simplement. Elle n'a donc jamais douté !!

Je rends hommage à mon cher père Mr Charles Saint Georges, « vié Charles », décédé le 22 mars 2012. C'est auprès de lui que j'ai développé le courage, la patience et la persévérance. Il me servira de modèle durant toute ma vie.

Merci seigneur pour tes bienfaits !

Abréviations

ATF-2 : Activating Transcription Factor 2

BCR : B-Cell Receptor

BLNK : B-cell Linker

Btk : Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase

BEC : Blood Endothelial Cells

CAMK : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase

CAR cell : CXCL12 Abundant Reticular cell

CCL19/21 : CC-motif Ligand 19/21

CD : Cellule Dendritique

CDR : Complementarity-Determining Region

CG : Centre Germinatif

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CMP : Common Myeloid Progenitor

CCR7 : CC-motif Receptor 7

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRD : Cystein-Rich Domain

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellule Souche Mésoenchymateuse

CXCL12/13 : CXC-motif Ligand 12/13

CXCR4/5 : CXC-motif Receptor 4/5

DAG : Diacylglycérol

EBI2 : Epstein-Barr virus-Induced G-protein coupled receptor 2

EBI2L : EBI2 Ligand

ELC : Epstein-Barr virus-induced gene 1 Ligand Chemokine

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

Erk : Extracellular signal-regulated kinase

FCR : Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab

FDC : Fibroblast Dendritic Cell

FGF-4 : Fibroblast Growth Factor-4

FRC : Fibroblast Reticular Cell

GAG : Glycosaminoglycane

GFP : Green Fluorescent Protein

GTP : Guanosine Triphosphate

GSK-3: Glycogène-Synthase Kinase 3

HEV : High Endothelial Venules

IAP : Integrin $\alpha 7+$ Péricytes

ICAM-1/2 : InterCellular Adhesion Molecule1/2

Ig : Immunoglobuline

IgM/D : Immunoglobuline de type M/D

IGVH : gènes variables des chaines lourdes des immunoglobulines

IL-7 : Interleukine 7

IL-7R : IL-7 Receptor

IP3 : Inositol 1,4,5- triphosphate

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

JNK : c-Jun NH2-terminal Kinase

LB : Lymphocyte B

LB-LLC : Lymphocyte B de Leucémie Lymphoïde Chronique

LEC : Lymphatic Endothelial Cell

LFA-1 : Leukocyte-Function-associated Antigen-1

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LT : Lymphocyte T

LTh : Lymphocyte T helper

LT-HSC : Long-Term hematopoietic Stem Cell

LYVE-1 : Lymphatic Vessel Endothelial HA receptor 1

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MeSC : Mesenchymal Stromal Cell

MMP-9 : Matrix Metalloproteinase-9

MPP : Multipotent Progenitor

MRC : Marginal Reticular Cell

MSC : Macrophage Sub-Capsulaire

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

NF-kB : Nuclear Factor kappa-B

NK : Natural Killer

NLC : Nurse Like Cell

PDK1 : Phosphoinositide Dependent Kinase-1

PH : Pleckstin Homology

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinases

PIP2 : Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PKD : Protéine Kinase D

PLC : Phospholipase C

PMA : Phorbol Myristate Acetate

PNAd : Peripheral Lymph Node Addressin

RAG : Recombination Activating Gene

RIN1 : Rab Interactor 1

S1P : Shingosine-1-Phosphate

S1P1 : Shingosine-1-Phosphate receptor 1

SDF-1 : Stromal cell Derived Factor-1

SH2/3 : Src Homology 2/3

SLC : Secondary Lymphoid Chemokine

SSC : Sinus Sub-Capsulaire

ST-HSC : Short-Term Hematopoietic Stem Cell

TCL1 : T-cell leukemia/lymphoma protein 1

TCR : T-cell Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

VCAM-1 : Vascular-Cell Adhesion Molecule-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLA-4 : Very Late Antigen-4

ZAP-70 : Zeta-chain-Associated Protein kinase 70

Table des matières

I.	Introduction-----	13
II.	Le microenvironnement médullaire : lieu de développement et de maturation des LB --	14
II.1.	Composition du microenvironnement médullaire : les niches hématopoïétiques----	15
II.1.1.	La niche endostéale/ostéoblastique-----	16
II.1.2.	La niche vasculaire/périvasculaire -----	17
II.1.3.	Relation entre la niche endostéale et la niche vasculaire : activation et mobilisation des CSH -----	18
II.2.	Régulation du développement et de la maturation des LB au sein du microenvironnement médullaire -----	19
II.2.1.	Développement et maturation des LB au cours de l'hématopoïèse -----	19
II.2.1.1.	L'hématopoïèse-----	19
II.2.1.2.	Les stades de maturation des LB -----	20
II.2.2.	Régulation du développement des CLP en pro-B par des facteurs de transcription-----	21
II.2.3.	Rôle du pré-BCR et du BCR dans les processus de sélection au cours du développement des LB-----	22
II.2.3.1.	Réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig et assemblage du pré-BCR au stade pré-B -----	24
II.2.3.1.1.	<i>Réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig -----</i>	24
II.2.3.1.2.	<i>Assemblage du pré-BCR au stade pré-B-----</i>	24
II.2.3.2.	Sélection positive des cellules pré-B : Checkpoint 1-----	25
II.2.3.3.	Réarrangement des gènes des chaînes légères des Ig et expression du BCR au stade de LB immature -----	26
II.2.3.4.	Sélection négative des LB immatures : Checkpoint2-----	27
II.2.4.	Régulation du développement des LB par les facteurs solubles du microenvironnement médullaire -----	28
II.2.4.1.	Rôle du CXCL12 et de l'IL-7 dans le développement des LB -----	28
II.2.4.2.	Modèle d'interaction des cellules B en cours de maturation avec le microenvironnement médullaire-----	29

III.	Le microenvironnement ganglionnaire : support du trafic des LB et de la stimulation antigénique -----	31
III.1.	Structure et composition cellulaire du ganglion lymphatique -----	32
III.1.1.	Les cellules stromales du ganglion -----	33
III.1.2.	Les cellules hématopoïétiques du ganglion -----	34
III.2.	Trafic ganglionnaire des LB -----	35
III.2.1.	Entrée des lymphocytes dans la zone paracorticale : homing ganglionnaire -----	36
III.2.1.1.	Les HEV : portes d'entrée des lymphocytes dans le ganglion -----	36
III.2.1.2.	Les étapes du homing ganglionnaire -----	36
	<i>III.2.1.2.1. Le roulement des lymphocytes (le Rolling) : Rôle du CD62L</i> -----	<i>37</i>
	<i>III.2.1.2.2. L'arrêt des lymphocytes (le sticking) : rôle du CCR7, du CXCR4 et du CXCR5</i> -----	<i>37</i>
	<i>III.2.1.2.3. L'extravasation des lymphocytes</i> -----	<i>38</i>
III.2.2.	Compartimentation des lymphocytes au sein du ganglion -----	39
III.2.2.1.	Le réseau réticulaire : véritables voies de circulation des lymphocytes -----	39
III.2.2.2.	Migration des LT vers la zone T et des LB vers les follicules -----	40
III.2.3.	Migration intra-folliculaire des LB : rôle des récepteurs CXCR5 et EB12 -----	41
III.2.4.	Sortie des lymphocytes du ganglion -----	42
III.2.4.1.	Les sinus paracorticaux : portes de sortie des lymphocytes du ganglion -----	42
III.2.4.2.	Régulation de la sortie des lymphocytes du ganglion -----	43
	<i>III.2.4.2.1. Rôle du récepteur SIP1 et de son ligand SIP</i> -----	<i>43</i>
	<i>III.2.4.2.2. Rôle de la L-sélectine (CD62L) et du CXCR4</i> -----	<i>44</i>
III.3.	Maturation des LB dans les follicules ganglionnaires : rôle de la stimulation antigénique -----	46
III.3.1.	Circulation des antigènes dans le ganglion -----	47
III.3.2.	Stimulation antigénique : présentation de l'antigène et activation des LB -----	48
III.3.2.1.	Présentation de l'antigène aux LB par les CPA dans les follicules -----	48
III.3.2.2.	Stimulation du BCR et activation des LB par les CPA -----	49
	<i>III.3.2.2.1. Le récepteur B à l'antigène (BCR)</i> -----	<i>49</i>

III.3.2.2.2. <i>Stimulation et initialisation de la signalisation du BCR</i>	50
III.3.2.2.3. <i>Voies de signalisation activées en aval du BCR</i>	52
III.3.2.3. Internalisation de l'antigène par les LB et présentation aux LT helpers	55
III.3.3. Maturation et différenciation des LB dans le centre germinatif	57
IV. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) : un modèle pathologique d'étude du microenvironnement médullaire et ganglionnaire	59
IV.1. La LLC est une pathologie dépendante du microenvironnement	59
IV.2. Interaction des LB-LLC avec les cellules du microenvironnement	60
IV.2.1. Interaction avec les cellules stromales mésenchymateuses (MeSC)	61
IV.2.2. Interaction avec les Nurse Like Cells (NLC) <i>in vitro</i> ou les macrophages <i>in vivo</i>	62
IV.2.3. Interaction avec les LT	63
IV.2.4. Les centres prolifératifs	64
IV.3. Attraction et rétention des LB-LLC au sein du microenvironnement : rôle du CXCR4, du CXCR5 et du CCR7	65
IV.3.1. Expression de CXCR4, CXCR5 et CCR7 dans les LB-LLC	65
IV.3.2. Modèle <i>in vitro</i> d'étude du rôle du CXCR4 dans l'attraction/rétention médullaire des LB-LLC	66
IV.3.3. Hypothèses formulées sur le rôle <i>in vivo</i> du CXCR4 dans l'attraction/rétention médullaire des LB-LLC	67
IV.4. Rôle du BCR dans la physiopathologie de la LLC	68
IV.4.1. Expression du BCR dans les LB-LLC	68
IV.4.2. Statut mutationnel du BCR des LB-LLC	68
IV.4.3. Auto-réactivité, poly-réactivité et stéréotypie du BCR dans la LLC	69
IV.4.4. Nature des antigènes reconnus par le BCR des LB-LLC	69
IV.4.5. Capacité hétérogène de signalisation du BCR des LB-LLC et relation avec l'évolutivité de la LLC	70
IV.4.6. Dérégulation des protéines des voies de signalisation du BCR dans la LLC	70
IV.4.6.1. Dérégulation des protéines de la signalisation précoce du BCR	71
IV.4.6.2. Dérégulation des protéines de la signalisation plus en aval du BCR	71
IV.4.6.3. Dérégulation de la voie de signalisation des PKC	71

IV.4.6.4.	Dérégulation des voies PI3K et NF-kB-----	72
IV.4.6.5.	Particularité dans la signalisation du BCR des LB-LLC : expression de ZAP-70 par les LB-LLC-----	73
IV.4.6.6.	Autres particularités : expression du CD5 et du CD38 par les LB-LLC -----	73
IV.5.	Les approches thérapeutiques ciblant le microenvironnement dans la LLC -----	74
IV.5.1.	Stratégie ciblant les voies de signalisation du BCR -----	75
IV.5.1.1.	Inhibition des protéines proximales du BCR : les kinases Lyn et Syk -----	75
IV.5.1.2.	Inhibition des protéines plus en aval du BCR : les kinases BtK et PI3K-----	76
IV.5.2.	Inhibition du récepteur CXCR4 -----	77
IV.5.3.	Restitution des capacités immuno-modulateurs des LT et des NK-----	77
V.	Structure et régulation de la signalisation du récepteur CXCR4-----	79
V.1.	Structure du CXCR4-----	79
V.2.	Régulation de la signalisation du CXCR4 -----	80
VI.	Structure, activation et fonction des Protéines Kinases D (PKD)-----	83
VI.1.	Les PKD appartiennent à la famille des protéines kinases calmoduline/Ca ²⁺ dépendantes (CAMK) -----	83
VI.2.	Processus d'activation des PKD par phosphorylation -----	84
VI.3.	Localisation sub-cellulaire des PKD-----	85
VI.4.	Fonctions diverses des PKD-----	86
VI.4.1.	Rôle des PKD dans la migration cellulaire -----	86
VI.4.2.	Rôle des PKD dans la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion cellulaire-----	87
VI.4.3.	Rôle des PKD dans la prolifération cellulaire-----	88
VI.4.4.	Rôle des PKD dans la signalisation du BCR-----	88
VII.	Objectifs de la thèse -----	90
VIII.	Résultats-----	91
VIII.1.	Downrégulation du CXCR4 et du CD62L en réponse à la stimulation du BCR des LB de Leucémie Lymphoïde Chronique et relation avec l'évolutivité de la maladie -----	92
VIII.1.1.	Introduction -----	92

VIII.1.2. Résultats-----	93
VIII.1.3. Article 1 -----	96
VIII.2. Implication des PKD dans la downrégulation du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR des LB de Leucémie Lymphoïde Chronique -----	97
VIII.2.1. Introduction -----	97
VIII.2.2. Résultats-----	97
VIII.2.3. Article 2 -----	100
VIII.2.4. Résultats complémentaires -----	101
VIII.3. L’AMD3100 perturbe le dialogue entre les LB de Leucémie Lymphoïde Chronique et les cellules stromales mésenchymateuses ou les Nurse Like Cells -----	105
VIII.3.1. Introduction et présentation des résultats -----	105
VIII.3.2. Article 3 -----	106
IX. Discussion et perspectives -----	107
X. Références-----	113

I. Introduction

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est la plus fréquente forme de leucémie de l'adulte dans le monde occidentale [1]. C'est un syndrome lymphoprolifératif chronique caractérisé par une expansion clonale de Lymphocytes B (LB) matures qui expriment les marqueurs de surface CD5 et CD19 et qui s'accumulent dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires. Bien que les LB de LLC (LB-LLC) circulants semblent être, de manière prédominante, bloqués en phase G₀ du cycle cellulaire, ils forment des agrégats de cellules de plus grande taille au sein de structures appelées centres prolifératifs [2] que l'on retrouve dans la moelle et dans le ganglion lymphatique. Ces données suggèrent que le microenvironnement médullaire et le microenvironnement ganglionnaire jouent un rôle dans la physiopathologie de la LLC.

Au sein du laboratoire, notre objectif vise à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'établissement du pool prolifératif de LB-LLC au sein du microenvironnement médullaire et ganglionnaire.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de la stimulation antigénique dans le trafic ganglionnaire des LB-LLC.

Il est donc apparu important de développer dans un premier temps en introduction, le microenvironnement médullaire qui est le lieu de développement et de maturation des LB naïfs au cours de l'hématopoïèse ; puis dans un deuxième temps le microenvironnement ganglionnaire qui constitue le support du trafic des LB, de la stimulation antigénique et de la différenciation des LB naïfs en LB mémoires et en plasmocytes.

En troisième partie, la LLC a été développée en tant que modèle pathologie d'étude du microenvironnement médullaire et ganglionnaire, en mettant l'accent sur le rôle du contact des LB-LLC avec les cellules du microenvironnement dans le trafic des LB-LLC, la survie et la prolifération des LB-LLC et en détaillant les effecteurs membranaires impliqués dans ces phénomènes.

Enfin, dans notre étude, nous avons analysé l'implication des protéines kinases D (PKD) dans la régulation de l'expression membranaire du CXCR4, le récepteur de la chimiokine CXCL12, en réponse à la stimulation du récepteur B à l'antigène (BCR) des LB-LLC. Le CXCR4 et la PKD ont ainsi fait l'objet dans une quatrième et cinquième partie respectivement, d'une introduction brève décrivant notamment leur structure et leurs processus d'activation.

II. Le microenvironnement médullaire : lieu de développement et de maturation des LB

Les lymphocytes B (Bursal ou Bone marrow-derived Lymphocyte) sont une population de cellules hématopoïétiques de petite taille (6-10 μ m) qui se développent dans les niches hématopoïétiques au sein du microenvironnement médullaire. Leur développement se caractérise par une succession de stades de maturation qui commencent dans la moelle et se poursuit dans les organes lymphoïdes secondaires [3]. Un des évènements indispensables à la poursuite de la maturation des LB dans la moelle est la formation du BCR composé d'une immunoglobuline de type M (IgM). Les LB immatures qui expriment un BCR fonctionnel ou non auto-réactif quittent la moelle osseuse, pénètrent dans le compartiment sanguin, commencent à exprimer l'IgD à leur surface et prennent la dénomination de LB naïfs, qui sont arrêtés au stade G0 du cycle cellulaire. Ces LB naïfs migrent via le sang vers les organes lymphoïdes secondaires où ils atteindront leur stade de maturation final.

Dans ce chapitre, nous développerons la composition du microenvironnement médullaire avant de s'intéresser plus précisément au rôle du BCR et des facteurs solubles du microenvironnement dans le développement et la maturation des LB.

II.1. Composition du microenvironnement médullaire : les niches hématopoïétiques

La moelle osseuse contient des **cellules souches hématopoïétiques** (CSH) en contact étroit avec des cellules stromales et des facteurs solubles qui constituent un microenvironnement complexe appelé **niche hématopoïétique** (**Fig. 1C**). Ces niches sont composées d'ostéoblastes et d'ostéoclastes à l'interface entre la moelle compacte et la moelle spongieuse (**Fig. 1B**), d'adipocytes, de cellules réticulaires, de macrophages et de cellules endothéliales vasculaires dans la moelle spongieuse et les cavités médullaires (**Fig. 1C**). Ce stroma spécialisé est responsable de la production de matrice extracellulaire, de cytokines et de facteurs de croissance nécessaires à la régulation, au maintien et à la migration des CSH [4]. Le stroma interagit avec les CSH via des récepteurs de surface cellulaire, des ligands membranaires et des facteurs solubles sécrétés, afin de réguler l'équilibre entre la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation de ces dernières.

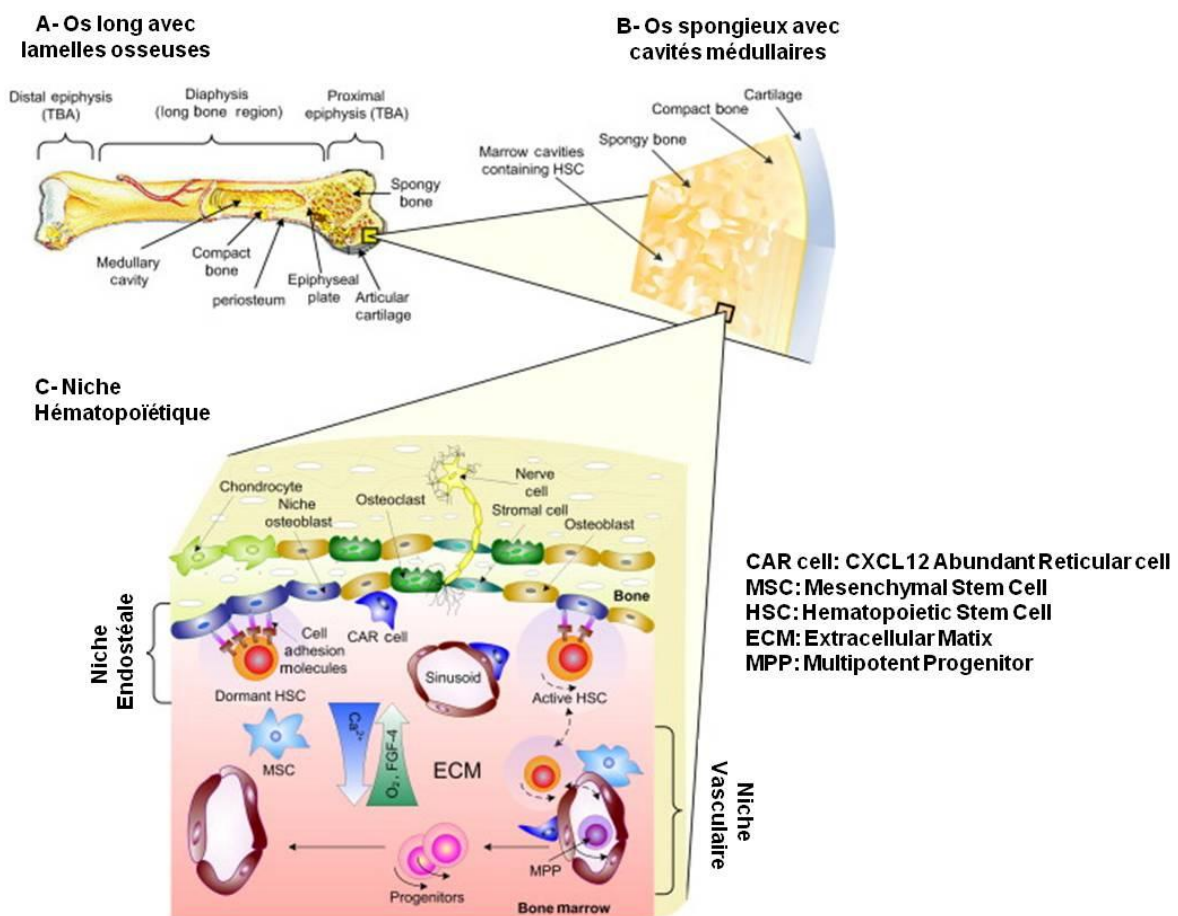


Figure 1 : Organisation spatiale de la niche hématopoïétique dans la moelle osseuse murine. A) Os long avec lamelles osseuses. B) Os spongieux avec cavités médullaires. C) Niche hématopoïétique. Modifié d'après Wasnik S et al. Int Rev Cell Mol Biol. 2012 [5].

D'après ce modèle proposé par Wasnik S *et al.*, il existe deux types de niches physiologiquement distinctes dans lesquelles résident les CSH : la **niche endostéale ou ostéoblastique** qui abrite des CSH quiescentes à l'interface avec la moelle et la **niche vasculaire ou périvasculaire** située autour de sinus vasculaires spécialisés où se trouvent des cellules plus différenciées.

II.1.1. La niche endostéale/ostéoblastique

Dans la **niche endostéale**, la majorité des CSH sont en contact étroit avec notamment des ostéoblastes et des ostéoclastes. L'interaction avec la niche endostéale permet d'inhiber la différenciation des CSH en les maintenant à l'état quiescent [6]. En particulier, l'interaction des CSH avec les ostéoblastes, est essentielle pour le maintien des cellules quiescentes (**Fig. 2**).

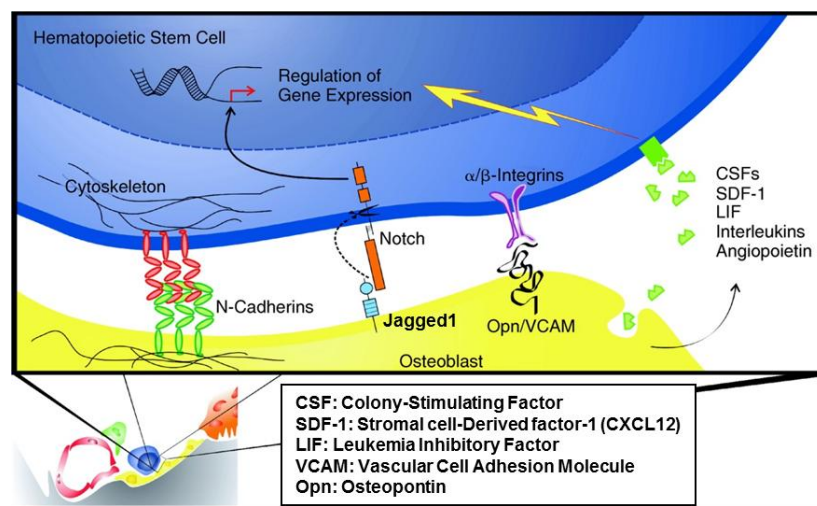


Figure 2 : Interactions moléculaires entre les ostéoblastes et les CSH quiescentes au sein de la niche endostéale. Modifié d'après Ter Huurne M et al. Stem Cells Dev.2010 [7].

D'après la figure 2, les **CSH quiescentes** interagissent avec les ostéoblastes aussi bien en utilisant des facteurs solubles, que des molécules de signalisation ou d'adhésion membranaires. En effet, les ostéoblastes peuvent d'une part sécréter des facteurs tels que l'angiopoïétine et le CXCL12 qui inhibent la prolifération des CSH et sont donc nécessaires au maintien des CSH à l'état quiescent [8, 9]. D'autre part, les liaisons homotypiques entre les molécules d'adhésion N-Cadhérines et l'interaction entre la molécule de signalisation Notch et son ligand jagged1 inhibent la prolifération et la différenciation des CSH et sont donc également importantes pour le maintien du pool des CSH quiescentes [10, 11].

II.1.2. La niche vasculaire/périvasculaire

La niche vasculaire abrite des **CSH actives**. Elle est composée de cellules endothéliales vasculaires, de cellules réticulaires riche en CXCL12 (CAR cell : CXCL12-Abundant Reticular Cell), de cellules souches mésenchymateuse (CSM) et de macrophages (**Fig. 3**).

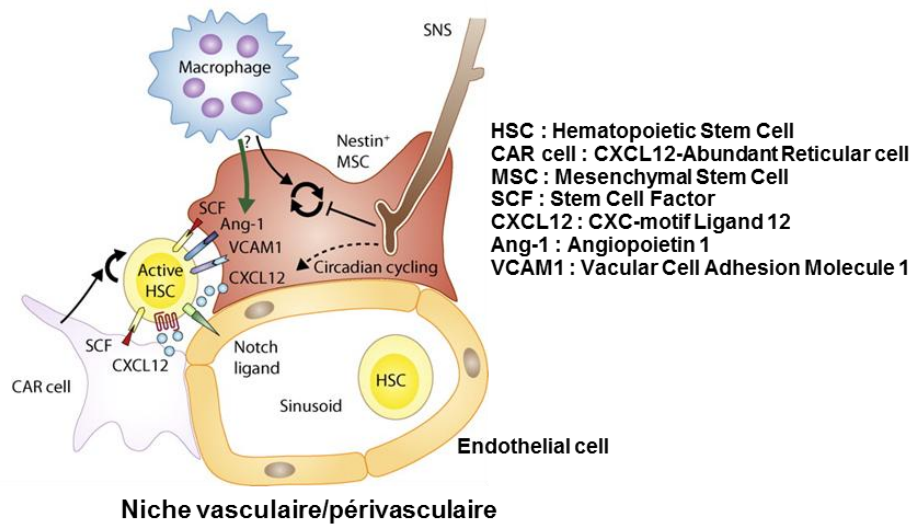


Figure 3 : Interactions moléculaires entre la niche périvasculaire et les CSH actives au sein de la niche vasculaire/périvasculaire. Modifié d'après Ehninger A et al. J Exp Med. 2011 [12].

Au niveau de la niche vasculaire, la majorité des « CSH actives » sont en contact, via des interactions moléculaires, avec les CAR cells et les CSM. Ces deux types cellulaires secrètent notamment la chimiokine CXCL12 dont l'interaction avec son récepteur CXCR4 est importante pour la mobilisation des « CSH actives » au sein de la niche vasculaire. D'autre part, la signalisation du Stem cell factor (SCF) à travers son récepteur c-Kit induit la prolifération, la survie et le recrutement des CSH actives [13].

On trouve également des vaisseaux sanguins qui définissent des sinus vasculaires qui consistent en une monocouche fenêtrée de cellules endothéliales. Ces cellules jouent un rôle important en apportant des facteurs essentiels à l'auto-renouvellement et à la différenciation des CSH [14].

Ainsi, en comparaison avec la niche endostéale, la niche vasculaire est le lieu privilégié pour la prolifération et la différenciation des CSH au sein de la niche hématopoïétique.

II.1.3. Relation entre la niche endostéale et la niche vasculaire : activation et mobilisation des CSH

La majorité des CSH se trouve à l'état quiescent au niveau de la niche endostéale. Pour initier les processus de différenciation, elles doivent être activées, afin de migrer vers la niche vasculaire qui se trouve à distance. Ce processus de recrutement des « CSH actives » au niveau des sinus vasculaires est appelé « mobilisation » et le processus inverse est appelé « homing » (**Fig. 4**).

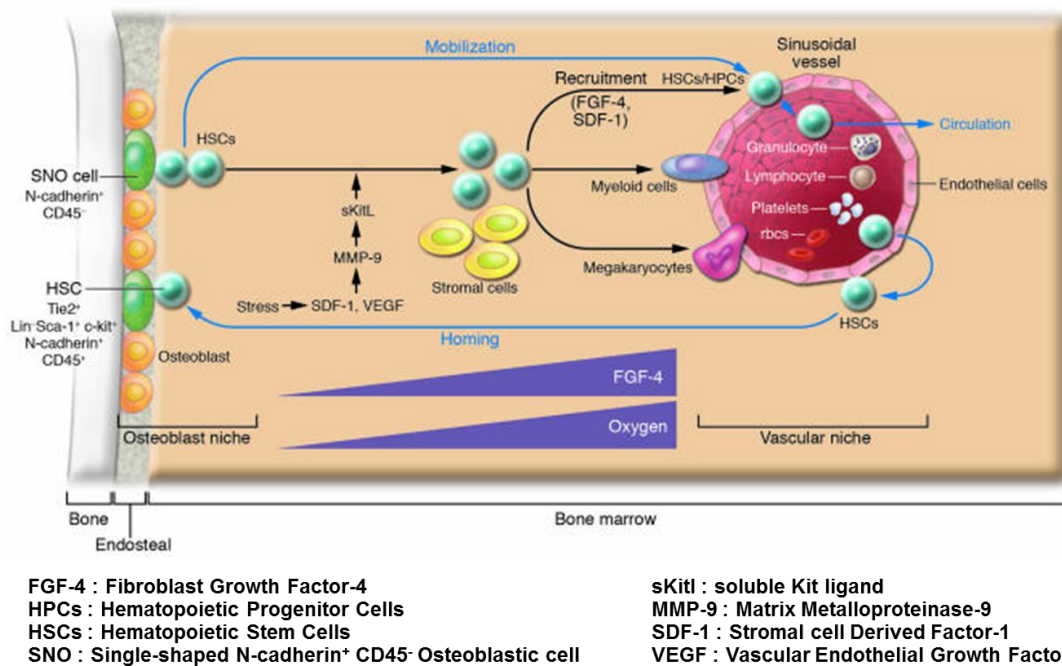


Figure 4 : Modèle illustrant les processus de mobilisation et de homing des CSH qui définissent le mouvement de ces cellules entre la niche endostéale/ostéoblastique et la niche vasculaire. Modifié d'après Yin T et Li L. J Clin Invest. 2006 [15].

L'activation du processus de mobilisation des CSH au niveau de la niche vasculaire dépend des facteurs VEGF et SDF-1 (CXCL12). Sous l'effet d'un stress, ces deux molécules activent la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) qui clive le ligand membranaire du récepteur Kit (mKitL) exprimé à la surface des cellules stromales et le transforme en ligand soluble (sKitL) [13]. sKitL active la prolifération, la mobilisation et la différenciation des CSH. D'après ce modèle proposé par Yin T et al, le recrutement des CSH au niveau des sinus vasculaires dépendrait des molécules FGF-4 et SDF-1. Les cellules endothéliales favorisent la transmigration des CSH à l'intérieur des vaisseaux et l'initiation de leur différenciation en diverses cellules hématopoïétiques selon un processus bien défini qui est l'hématopoïèse.

II.2. Régulation du développement et de la maturation des LB au sein du microenvironnement médullaire

II.2.1. Développement et maturation des LB au cours de l'hématopoïèse

II.2.1.1. L'hématopoïèse

Toutes les cellules hématopoïétiques dérivent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes [16] par un processus de maturation complexe qui est l'hématopoïèse. Au cours de l'hématopoïèse, la différenciation des CSH en cellules hématopoïétiques matures se déroule de manière hiérarchique en passant par divers types cellulaires intermédiaires définis par l'expression de différents marqueurs moléculaires de surface (Fig. 5). Les divers intermédiaires perdent progressivement leur caractère pluripotent en s'engageant dans une voie de différenciation.

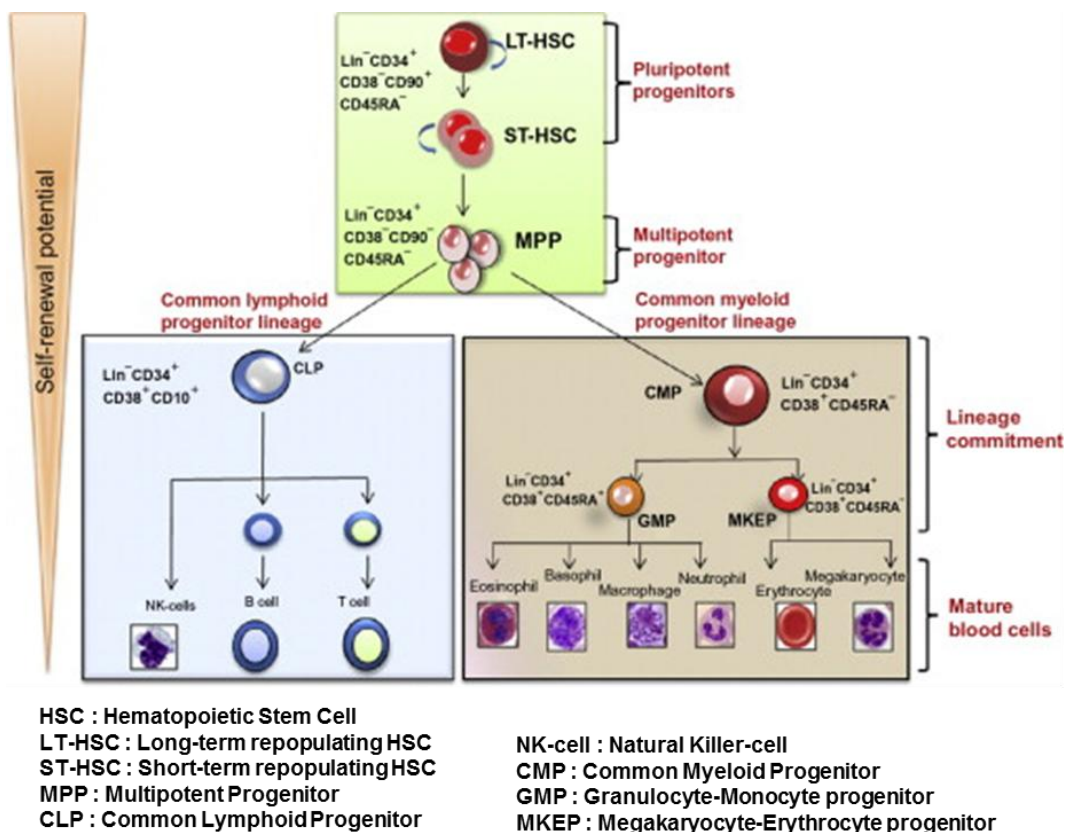


Figure 5 : Modèle représentant la hiérarchie cellulaire au cours de l'hématopoïèse humaine et les différents marqueurs exprimés à la surface des cellules. Modifié d'après Wasnik S et al. Int Rev Cell Mol Biol. 2012 [5].

Les Long-Term Hematopoïétique Stem Cell (LT-HSC) sont en haut de la hiérarchie et sont considérées comme les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes les plus primitives. Elles dérivent en Short-Term HSC (ST-HSC) qui ont également un caractère pluripotent. Les ST-HSC dérivent ensuite en (Multipotent Progenitor) MPP qui perdent la capacité d'auto-renouvellement mais conservent un caractère multipotent. Les MPP dérivent en deux progéniteurs unipotents qui sont à l'origine de toutes les cellules hématopoïétiques matures : les Common Myeloid Progenitor (CMP) et les Common lymphoid Progenitor (CLP) qui définissent deux grandes voies de différenciation. Les CMP sont à l'origine des Granulocyte-Monocyte Progenitor (GMP) qui se différencient en cellules dendritiques, en granulocytes et en macrophages ; et à l'origine des Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor (MKEP) qui se différencient en mégacaryocytes et érythrocytes [17]. Tandis que les progéniteurs de la lignée lymphoïde, les **Common Lymphoid Precursor (CLP)** sont à l'origine des cellules Natural Killer (NK), des Lymphocytes T (LT) et des **lymphocytes B (LB)** [18].

II.2.1.2. Les stades de maturation des LB

Le développement des LB à partir des CLP se décompose en une succession de stades de différenciation distincts caractérisés par l'expression de différents marqueurs de surface. La plupart des connaissances sur le développement des cellules B émanent d'études faites sur la souris. Les souris offrent la possibilité de faire des expériences *in vivo* avec l'utilisation de modèle de souris génétiquement modifiées, alors que la plupart des expérimentations sur les cellules humaines sont réalisées *in vitro*. Même si les cellules B humaines ne présentent pas les mêmes marqueurs de surface que les cellules murines, au cours du développement, les principes de développement sont superposables. Au début des années 1990, Hardly et al. ont montré que chez la souris, les progéniteurs B220 se différencient séquentiellement en pré-pro-B, en early pro-B, en late pro-B et en pre-B avant d'atteindre le stade de LB immature [19].

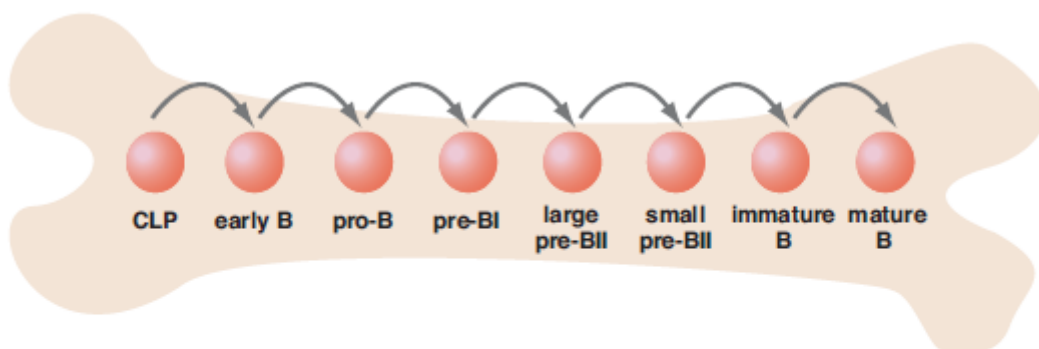


Figure 6 : Les stades précoces du développement des LB humains. Blom B and Spits H, Annu Rev Immunol. 2006 [20].

Fonctionnellement, des stades de développement similaires ont été retrouvés au cours du développement B humain, bien que la transition entre CLP et early B ne soit pas très bien établie. La différenciation est caractérisée par la perte progressive de l'expression du marqueur de surface CD34 et par une expression de plus en plus forte du marqueur CD19 à la surface.

Le consensus propose que lors de leur développement précoce, les LB humains passent par les stades de développement suivant (**Fig. 6**) : CLP (CD34+ CD10+ CD19-); early B (CD34+ CD10+ CD19-); pro-B (CD34+ CD10+ CD19+); large pré-BI (CD34- CD10+ CD19+); large pré-BII (CD34- CD10+ CD19+); smal pré-BII (CD34- CD10+ CD19+); LB immature (CD34- CD10+ CD19+ IgM+); LB mature (CD34- CD10- CD19+ IgM+ IgD+).

II.2.2. Régulation du développement des CLP en pro-B par des facteurs de transcription

La différenciation des CLP en pro-B est sous la dépendance de trois facteurs de transcription: **E2A**, **EBF** et **Pax5** [21] (**Fig. 7**).

- Le gène **E2A** code pour 4 isoformes obtenues par épissage alternatif qui sont E12, E47, HEB et E2-2 et qui constituent la famille des protéines bHLH aussi appelée E protéines. Le développement des cellules B dans les souris $E2A^{-/-}$ est arrêté aux stades précoces du fait de l'absence de réarrangements des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig). La lymphopoïèse B est dépendante de toute la famille E2A. En effet, le développement des pro-B est sévèrement affecté en absence de E12 ou E47 et réduit en absence de HEB ou E2-2 [22, 23].

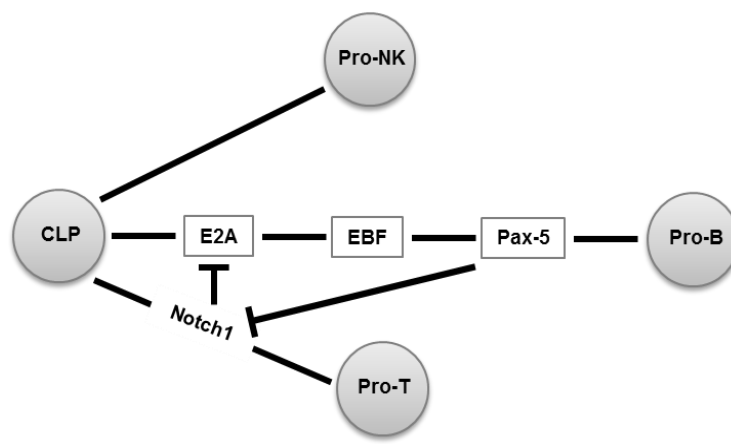


Figure 7 : Contrôle transcriptionnel dans le développement des LB humains. Modifié d'après Busslinger M. Annu Rev Immunol. 2004 [24].

- L'introduction de **EBF** dans des progéniteurs hématopoïétiques issus du foie fœtal conduit à l'activation des processus de recombinaison des gènes des Ig via l'augmentation de l'expression des protéines RAG-1, RAG-2, CD19, $\lambda 5$ et VpreB [25]. Ces données indiquent qu'EBF contrôle l'accessibilité de la machinerie de transcription aux régions variables des gènes des Ig et l'expression des RAG. A travers son contrôle de l'expression du pré-BCR et du BCR, EBF joue un rôle central dans l'engagement dans la lignée B.

- **Pax5**, aussi appelé BSAP est exprimé dans le système hématopoïétique exclusivement dans la lignée B. En absence de Pax5, l'activation de gènes spécifiques de la lignée B et des réarrangements V(D)J des gènes des Ig par E2A et EBF ne sont pas suffisant pour l'engagement des progéniteurs dans la lignée B [26]. Pax5 est essentiel pour l'engagement dans la lignée B et pour le maintien de la restriction à la lignée B en permettant la transcription de gènes spécifiques impliqués dans la signalisation du pré-BCR et du BCR et en permettant la répression des gènes spécifiques impliqués dans la signalisation des lignées non B (**fig. 8**).

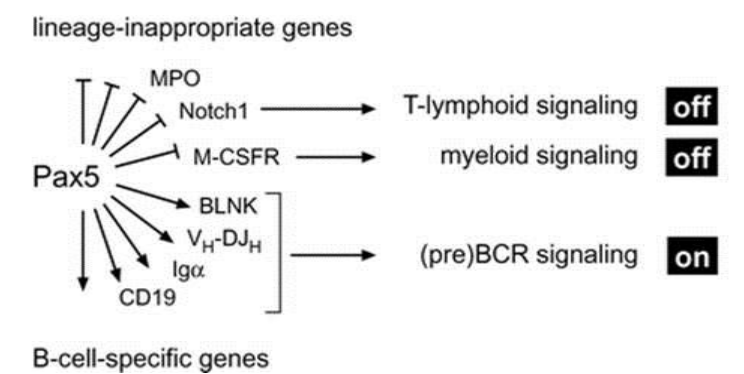


Figure 8 : Gènes réprimés ou activés par le facteur de transcription Pax-5. Busslinger M. Annu Rev Immunol. 2004 [24].

II.2.3. Rôle du pré-BCR et du BCR dans les processus de sélection au cours du développement des LB

Le **BCR** est composé d'une Ig qui consiste en deux chaînes lourdes et deux chaînes légères qui contiennent un domaine constant et un domaine variable (**Fig. 9**). Le domaine variable des chaînes lourdes est composé des régions Variable (V), Diversité (D) et Jonction (J) (**V(D)J**), alors que le domaine variable des chaînes légères ne comporte que les régions V et J (**VJ**).

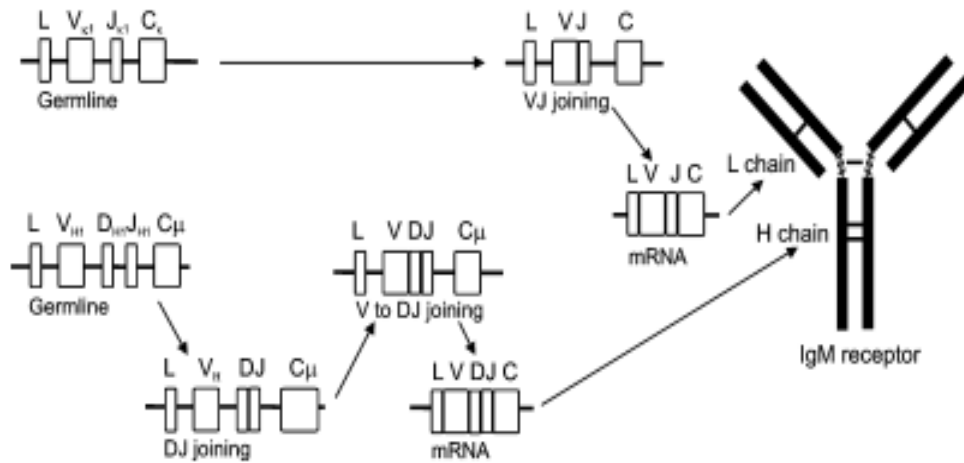


Figure 9 : Processus de réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères des IgM. Ollila J et al. 2004. Int J Biochem Cell Biol [27].

La formation du BCR se déroule en deux étapes (**Fig. 10**) :

- la première étape est l'assemblage du pré-BCR au stade pré-B. Elle est associée à un point de contrôle (**checkpoint 1**) au niveau de la transition pré-BI/pré-BII, qui permet de vérifier la fonctionnalité de la chaîne lourde du pré-BCR ;
- la deuxième étape est la formation du BCR au stade immature. Elle est associée à un point de contrôle (**checkpoint 2**) qui a pour but de tester la fonctionnalité du BCR et d'éliminer les LB possédant des récepteurs auto-réactifs.

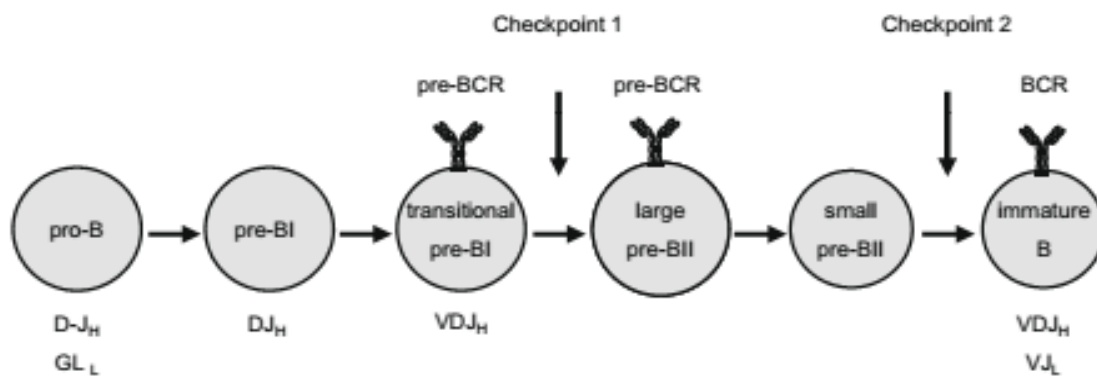


Figure 10 : Illustration schématique du développement précoce des LB et des points de contrôle. Martensson IL et al. FEBS Lett. 2010 [28].

II.2.3.1. Réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig et assemblage du pré-BCR au stade pré-B

II.2.3.1.1. Réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig

Lors de la formation du pré-BCR, les gènes V(D)J des chaînes lourdes des Ig subissent des processus de réarrangement ou recombinaison (**Fig. 11**).

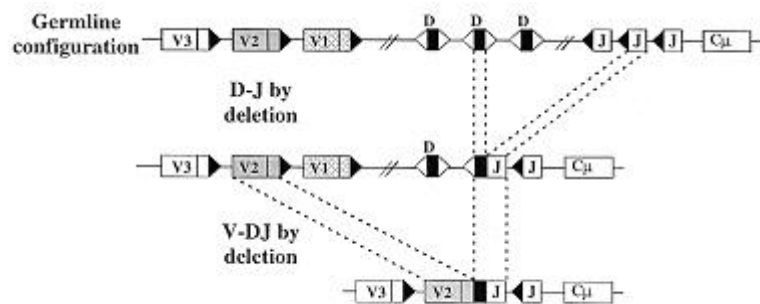


Figure 11 : Réarrangements de la chaîne lourde des Ig. Seagal J et al. *Histol Histopathol.* 2003 [29].

La figure 11 représente la configuration germinale des gènes V, D, et J des chaînes lourdes des Ig qui ont la même orientation transcriptionnelle. Les processus de **recombinaisons** sont initiés au stade **pro-B** par la liaison d'un élément D à un élément J pour former un segment DJ par **délétion** de l'ADN intermédiaire (**Fig. 10 et 11**). Ceci est suivi par la liaison d'un élément V au segment DJ par délétion de l'ADN intermédiaire également pour former un segment VDJ au stade pre-BI.

Les réarrangements efficaces permettent aux LB de synthétiser une chaîne lourde μ capable de s'associer à une chaîne légère de substitution composée des protéines VpréB et $\lambda 5$ pour former le **pré-BCR** au stade **pré-B** [30].

II.2.3.1.2. Assemblage du pré-BCR au stade pré-B

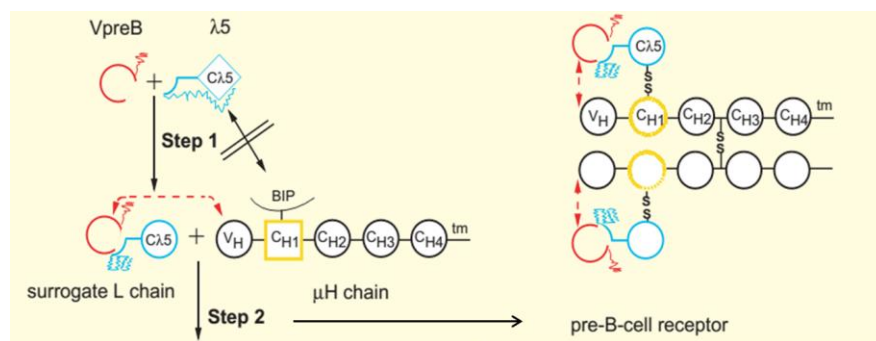


Figure 12 : Model de formation du pré-BCR proposé par Melchers F et al. *Immunol Rev.* 2013 [31].

Lors de la formation du pré-BCR, une chaîne lourde μ s'associe initialement à la protéine chaperonne BIP, et les protéines VpreB et $\lambda 5$ s'associent entre elles de manière non covalente pour former la chaîne légère de substitution (**Fig. 12**). Cette association permet un changement de conformation de la protéine $\lambda 5$ qui peut ensuite remplacer la protéine BIP et permettre à la chaîne légère de substitution de se lier à la chaîne μ par des ponts disulfures pour former le pré-BCR [32]. L'expression du pré-BCR à la surface cellulaire nécessite son association avec les molécules de transduction du signal Ig α et Ig β [30]. Après l'assemblage du pré-BCR, ses capacités de signalisation sont vérifiées lors du **checkpoint 1** qui est crucial pour la poursuite du développement des LB.

II.2.3.2. Sélection positive des cellules pré-B : Checkpoint 1

Durant le checkpoint 1, les capacités de signalisation de la chaîne lourde μ nouvellement formée qui constitue le pré-BCR, sont vérifiées. La signalisation du pré-BCR constitue un événement important dans les processus de **sélection positive** des cellules pré-BI (**Fig. 13**).

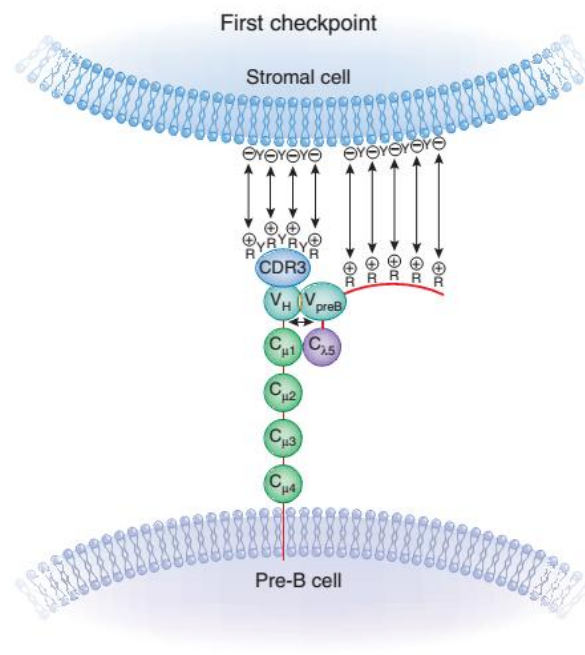


Figure 13 : Modèle d'activation du pré-BCR lors du premier check-point au cours du développement précoce des LB. von Boehmer H et al. Nat Immunol. 2010 [33].

D'après le modèle, une portion non Ig, riche en arginine, chargée positivement, de la protéine $\lambda 5$ (ligne rouge) interagit avec des résidus qui portent des charges opposées au niveau des cellules stromales de la moelle (**Fig. 13**). Certaines régions CDR3 (complémentary determining region-3) de la chaîne μ peuvent accumuler des résidus tyrosines chargés positivement et agir de la même façon. La liaison entre les résidus arginines chargés positivement portés par la portion non Ig de la protéine $\lambda 5$

et des résidus chargés négativement portés par des acides nucléiques ou d'autres molécules au niveau des cellules stromales initie la signalisation du pré-BCR [34]. La **signalisation du pré-BCR** induit la prolifération des cellules pré-BI et la down-régulation des protéines RAG, ce qui inhibe les processus de réarrangements des gènes des chaînes lourdes des Ig. Dans le cas où les cellules pré-B ne forment pas un pré-BCR fonctionnel, les cellules ne prolifèrent pas et restent bloquées à ce stade du développement des LB.

II.2.3.3. Réarrangement des gènes des chaînes légères des Ig et expression du BCR au stade de LB immature

Après le checkpoint 1, les pré-BI sélectionnés font plusieurs cycles de division en passant au stade large pré-BII, puis cessent de proliférer et passent au stade small pré-BII [35]. Ces **small pré-BII** réactivent la machinerie de recombinaison au niveau des **gènes VJ** des **chaînes légères** d'abord κ , puis λ [36]. Le but des recombinaisons des chaînes légères est de lier les éléments V aux éléments J pour former le domaine variable de la chaîne légère (**Fig. 14**).

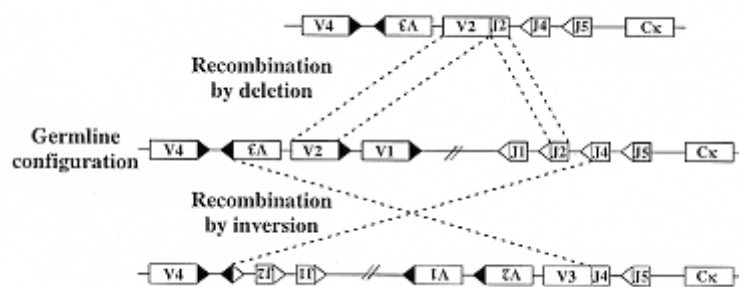


Figure 14 : Réarrangement de la chaîne légère des Ig. Seagal J et al. *Histol Histopathol.* 2003 [29].

La figure représente la configuration germinale du locus κ des gènes de la chaîne légère des Ig composé des segments V et J. Une partie des gènes V (V1, V2 et V4) ont la même orientation transcriptionnelle que les gènes J, alors que V3 a une orientation différente. La recombinaison entre les gènes qui ont la même orientation se fait par **délétion**, alors que celle qui concerne des gènes qui ont une orientation différente se fait par **inversion**. Les recombinaisons correctes de la chaîne légère conduisent à un remplacement de la chaîne légère de substitution par les chaînes légères conventionnelles Ig κ et Ig λ pour former le BCR, et à la progression au stade de LB immature [35]. La fonctionnalité de ce BCR est vérifiée lors du **checkpoint 2**.

II.2.3.4. Sélection négative des LB immatures : Checkpoint 2

Les LB immatures vont être sujets à la sélection négative imposée par la tolérance immune (**Fig. 15**). Ces processus de sélection négative qui ont lieu dans la moelle osseuse sont très importants pour limiter la production d'auto-anticorps et dépendent de l'avidité et du seuil de signalisation du BCR [37]. La théorie de **sélection clonale**, proposée par Sir Frank Macfarlane Burnet en 1959, prédit que les cellules auto-réactives seraient éliminées [38].

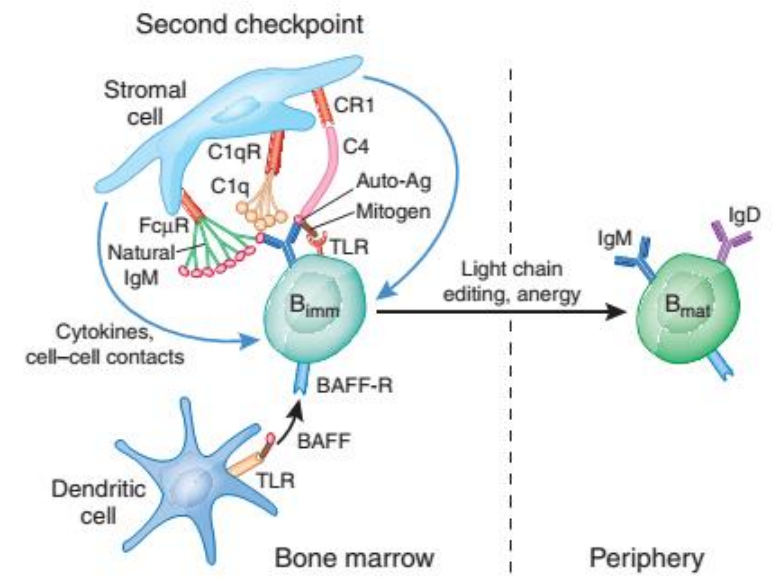


Figure 15 : Modèle d'établissement des mécanismes de sélection négative lors du second check-point au cours du développement précoce des LB. von Boehmer H et al. Nat Immunol. 2010 [33].

D'après ce modèle, le BCR des cellules immatures interagit avec des auto-antigènes liés à des molécules d'IgM elles même associées à des fragments Fc portés par les cellules stromales, ou avec des auto-antigènes liés directement à des molécules du complément (C1q, C4). Les BCR qui interagissent fortement avec les auto-antigènes induisent la réédition de la chaîne légère et ceux qui interagissent faiblement avec les auto-antigènes induisent l'anergie des cellules B immatures. L'auto-réactivité peut être contrôlée par la sélection clonale qui détermine la mort ou la survie d'un clone de LB immature. Durant le développement de cellules B, beaucoup de cellules polyréactives [39] et la majorité des cellules auto-réactives sont éliminées durant la transition pré-BII/LB immature. Dans certaines maladies auto-immunes ces cellules pré-BII poly et auto-réactives ne sont pas éliminées, suggérant un rôle important du checkpoint 2 dans la prévention de telles maladies.

II.2.4. Régulation du développement des LB par les facteurs solubles du microenvironnement médullaire

En 1982, Whitlock et Witte ont mis au point un système de culture *in vitro* permettant le développement des précurseurs des cellules B [40]. Depuis, plusieurs lignées de cellules stromales permettant le développement *in vitro* des cellules B ont été établies [41]. Cela a permis de mettre en évidence un certain nombre de facteurs issus du microenvironnement qui sont indispensables au développement des LB *in vivo* dont le **CXCL12** et l'**IL-7**.

II.2.4.1. Rôle du CXCL12 et de l'IL-7 dans le développement des LB

La chimiokine **CXCL12** (SDF1 ou PBSF) a été isolé à partir de lignées de cellules stromales et utilisée pour le développement *in vitro* des LB [42]. Elle est décrite comme étant un facteur soluble stimulant la prolifération des cellules pré-B [43]. Le principal récepteur du CXCL12 est le CXCR4. Le nombre de précurseurs pré-pro-B est diminué dans la moelle osseuse de souris adultes déficientes en CXCR4 [43]. L'axe CXCL12-CXCR4 est ainsi essentiel pour les stades précoces de développement B. Par ailleurs, CXCR4 est également important pour la rétention des cellules pré-B dans la moelle osseuse [44].

L'**IL-7** a été isolé sur la base de son habilité à induire la prolifération des cellules pro-B et est la première cytokine décrite comme étant essentielle pour la lymphopoïèse [45]. L'IL-7 est un facteur de croissance essentiel pour le développement des progéniteurs B murins, et notamment au niveau des CLP, en potentialisant le programme de différenciation des LB [46]. L'analyse de la moelle osseuse des souris déficientes en IL-7 ou IL-7R α montre un nombre normal de cellules pré-pro-B mais un nombre sévèrement réduit de pro-B, de pré-B et de cellules plus différenciées. De plus, une étude a montré que dans des souris déficientes en IL7-R, les réarrangements V(D)J des chaînes lourdes des Ig sont défectueux [47]. Enfin, l'IL-7 induit la prolifération *in vitro* des pro-B, mais pas des pré-pro-B [48]. Ces résultats indiquent que l'IL-7 joue un rôle crucial dans le développement des LB murins à partir du stade pro-B.

Cependant, le rôle de l'IL-7 dans le développement des LB humain semble différent. En effet, l'IL-7 a un effet minimal sur la prolifération des progéniteurs B humains et n'est pas essentielle pour la différenciation de la lignée B [49]. La stimulation par l'IL-7 entraîne une augmentation spécifique du CD19 membranaire sur les cellules pro-B, une diminution du taux de RAG1 de RAG-2 et de TdT [50].

Ainsi, bien que l'IL-7 ne soit pas essentielle pour le développement B humain, elle conduit à des régulations d'expression de gènes clés impliqués dans le développement précoce des LB.

II.2.4.2. Modèle d'interaction des cellules B en cours de maturation avec le microenvironnement médullaire

Les facteurs décrits précédemment, requis pour le développement B, sont produits par des cellules du microenvironnement médullaire. Ces cellules constituent des niches spécifiques capables de délivrer les facteurs appropriés aux cellules B précurseurs, aux stades de différenciation appropriés. Quelles cellules du microenvironnement sont capables d'une telle fonction ?

Plusieurs types cellulaires localisés dans le microenvironnement ont été identifiés comme ayant un rôle dans le développement B. Parmi ces cellules, nous pouvons citer les **ostéoblastes**, les **cellules réticulaires riches en CXCL12** et les **cellules fibroblastiques** qui expriment l'IL-7 (**fig. 16**).

Les **ostéoblastes** sont des cellules spécialisées responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire au sein de la moelle. Elles dérivent des cellules souches mésenchymateuses et ont un rôle important dans le développement des os. Une étude *in vitro* a montré que des ostéoblastes murins primaires peuvent supporter le développement des cellules early-B [51]. Les ostéoblastes joueraient donc un rôle important dans le développement des LB.

Il est admis que le CXCL12 est requis pour le développement des pré-pro-B [43]. L'étude de la localisation des cellules exprimant le CXCL12 a été réalisée en utilisant des souris dont le gène codant pour le CXCL12 a été remplacé par la GFP [52]. Un fort taux de GFP a été retrouvé au niveau d'une petite population de cellules stromales que l'on a donc appelées cellules réticulaires riches en CXCL12 (**CAR cells**) (**Fig.16**).

Une analyse par immunohistochimie a montré que certaines cellules de type fibroblastique qui expriment VCAM-1 sont marquées positivement avec un anticorps anti-IL-7 [53]. Ces cellules appelées « IL-7 expressing cells » dans la figure 16 sont comme les cellules réticulaires riches en CXCL12, dispersées dans la moelle osseuse.

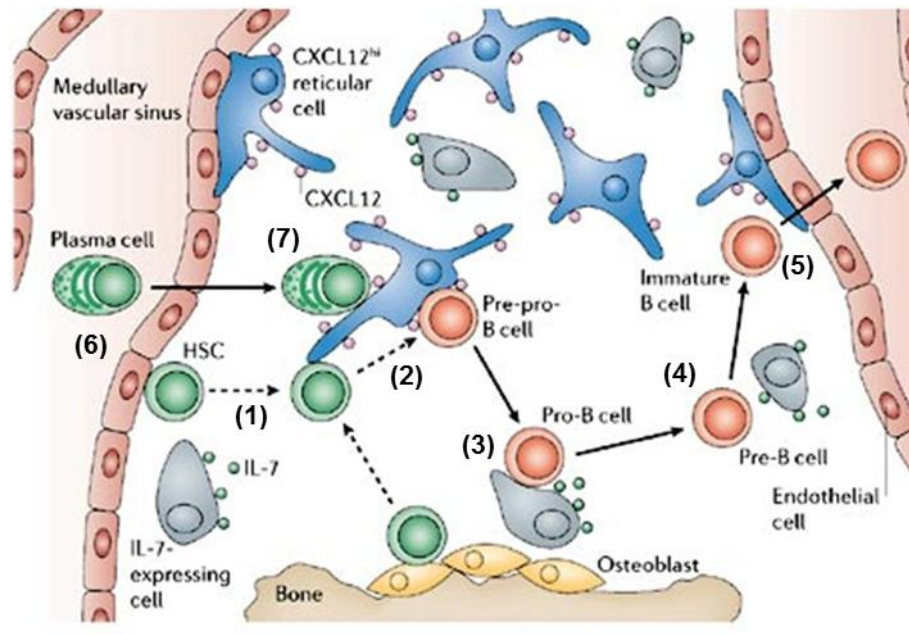


Figure 16 : Modèle d'interaction entre les précurseurs des LB et les cellules du microenvironnement médullaire au cours de la différenciation des LB murins. Nagasawa T et al. Nat Rev Immunol. 2006[54].

La figure 16 illustre un modèle murin d'interaction des précurseurs de LB avec les cellules du microenvironnement médullaire, au cours du développement des LB. Ce modèle propose des interactions séquentielles des différents stades de différenciation des LB avec les cellules stromales. (1) les CSH migrent vers les cellules réticulaires riches en CXCL12. (2) C'est au niveau de ces dernières qu'a lieu le développement des CSH en pré-proB, puis en pro-B. (3) Les pré-proB restent localisés au niveau des cellules réticulaires riches en CXCL12 alors que les pro-B migrent vers les cellules fibroblastiques exprimant l'IL-7, où elles se différencient en pré-B. (4) Les pré-B migrent ensuite vers les vaisseaux sanguins, tout en continuant leur différenciation. (5) Les LB immatures quittent la moelle osseuse via les vaisseaux sanguins pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (Ganglion, rate) où ils atteindront leur stade de maturation final, les plasmocytes. (6) Ces derniers peuvent quitter les organes lymphoïdes secondaires, rejoindre la moelle via le sang puis (7) migrer vers et s'associer aux cellules réticulaires riches en CXCL12, permettant ainsi une boucle de circulation des LB entre la moelle, le sang et les organes lymphoïdes secondaires.

III. Le microenvironnement ganglionnaire : support du trafic des LB et de la stimulation antigénique

La deuxième étape du développement des LB se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires dont le ganglion lymphatique. Les LB naïfs pénètrent dans cet organe, migrent vers les follicules, des compartiments spécifiques où ils rencontrent des antigènes, s'activent et se différencient en LB mémoires et en plasmocytes. LB mémoires se différencient en centroblastes qui subissent le switch de class des Immunoglobulines (Ig), et les mutations somatiques des chaînes lourdes des Ig. Ces cellules progressent ensuite vers le stade de centrocytes qui expriment des Ig de haute affinité. Ces centrocytes se différencient en LB mémoires ou en plasmocytes capables de sécréter des anticorps et de retourner coloniser la moelle osseuse [55].

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes structures et les types cellulaires qui composent le microenvironnement ganglionnaire. Une partie sera ensuite dédiée à détailler point par point les processus impliqués dans l'entrée, la migration intra-ganglionnaire et la sortie des LB du ganglion. Nous mettrons notamment un accent sur le rôle des couples chimiokines/récepteurs de chimiokines dans ces processus. Enfin, une dernière partie sera consacrée à expliquer le rôle de la stimulation antigénique dans la maturation et la différenciation des LB en LB mémoires et en plasmocytes.

III.1. Structure et composition cellulaire du ganglion lymphatique

Le ganglion lymphatique consiste en de nombreux lobules lymphoïdes, entourés de sinus lymphatiques qui sont enveloppés par une capsule (**Fig. 17**). Un lobule lymphoïde est l'unité anatomique et fonctionnelle de base du ganglion. Il est entouré d'un réseau complexe de sinus lymphatiques qui se divise en sinus sub-capsulaires, sinus transversaux et sinus médullaires selon l'axe apico-basal. Un unique vaisseau lymphatique délivre un flux constant de liquide lymphatique au sinus sub-capsulaire de chaque lobule. Les sinus lymphatiques de tous les lobules convergent vers un unique vaisseau lymphatique efférent qui quitte le ganglion.

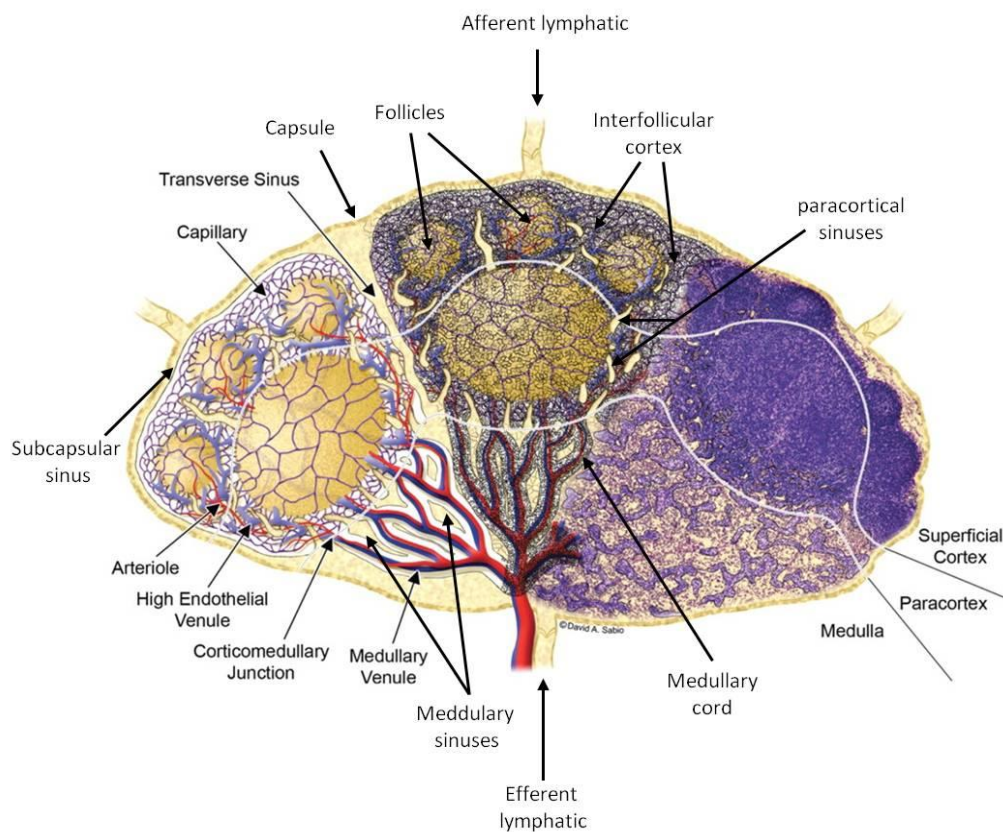
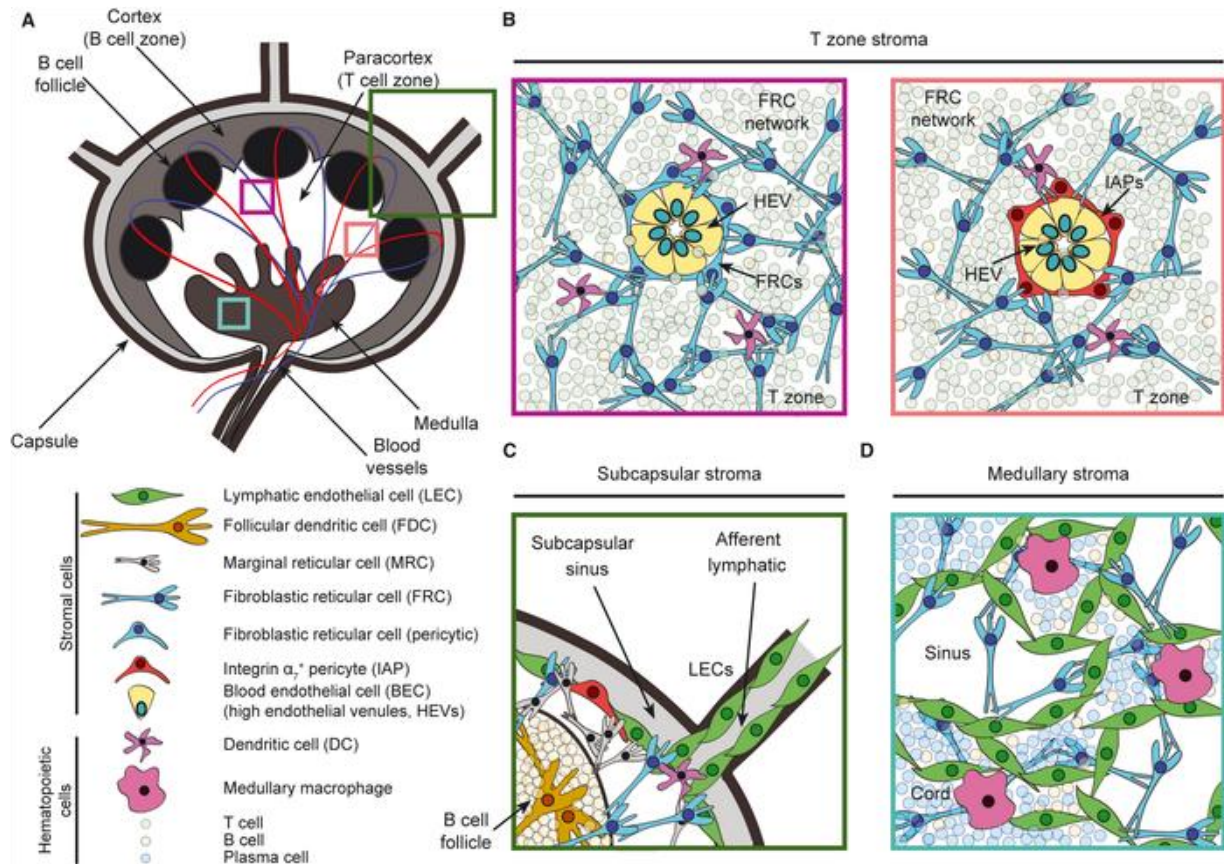


Figure 17 : Structure d'un ganglion lymphatique contenant 3 lobules lymphoïdes. D'après Willard-Mack CL., Toxicol Pathol. 2006 [56].

Les lobules ont une extrémité proéminente et une base formée de cordes minces appelées cordes médullaires, qui donne une apparence médusoïde. Chaque lobule peut être divisé en trois compartiments distincts : le cortex, formé par les follicules et le cortex inter-folliculaire qui les entoure, le para-cortex qui contient les sinus para-corticaux et la zone médullaire qui contient les

cordes médullaires et les sinus médullaires. Chaque lobule est composé d'un réseau de structures vasculaires formé par des veinules dans la zone médullaire, des artérioles et des veinules spécialisées appelées High Endothelial Venules (HEV) dans le paracortex et des capillaires sanguins dans le cortex [57].

Les différents compartiments du ganglion sont caractérisés par la présence de cellules stromales et de cellules hématopoïétiques de natures différentes (**fig. 18**).



III.1.1. Les cellules stromales du ganglion

Les cellules stromales du ganglion sont une population hétérogène. On les distingue par leur expression de marqueurs de surface tels que la glycoprotéine CD31 et la podoplanine (gp38), et par leur localisation dans les différents compartiments du ganglion. On distingue ainsi les Fibroblastic Reticular Cells (FRC), gp38⁺/-CD31⁻ ; les Follicular Dendritic Cells (FDC), gp38⁺/- CD31⁻ ; les

Lymphatic Endothelial Cells (LEC), gp38+CD31+ ; les Blood Endothelial Cells (BEC), gp38-CD31+ ; les Marginal Reticular Cells (MRC), gp38+ ; les Integrin α 7+ Péricytes (IAP), gp38-CD31-ITGA7+ ; et une petite proportion (<5%) de cellules stromales non caractérisées, gp38-CD31-ITGA7-[59].

Au niveau du para-cortex, on retrouve les BEC qui sont des cellules endothéliales spécialisées qui forment les HEV. Les HEV sont des vaisseaux endothéliaux qui régulent l'entrée dans le ganglion des lymphocytes et des cellules dendritiques sanguines (CD). Ces structures sont majoritairement entourées par des FRC ou minoritairement (<15%) par des IAP qui forment une spirale autour d'elles. Un réseau de FRC occupe majoritairement également le para-cortex. Dans la zone subcapsulaire, une couche de LEC tapisse les vaisseaux lymphatiques afférents et sert de séparation entre le sinus subcapsulaire et le parenchyme des follicules. On retrouve dans cette zone subcapsulaire les MCR, les FRC et les IAP. Dans les follicules, on trouve des FDC qui sont des cellules stromales spécialisées dans la capture des antigènes et leur présentation aux LB. Quant à la médulla, elle est majoritairement occupée par un réseau dense de FRC et de LEC qui tapissent les sinus.

III.1.2. Les cellules hématopoïétiques du ganglion

Le ganglion lymphatique est un carrefour essentiel pour la rencontre entre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les antigènes qui proviennent de la lymphe et les lymphocytes recrutés au niveau du ganglion en provenance du sang. Il est de ce fait largement occupé par différentes populations hématopoïétiques qui interagissent entre elles dans les différents compartiments : les LT, les LB, les CD et les macrophages.

Les LT ainsi que les CD, se localisent préférentiellement dans le paracortex, alors que les lymphocytes B se localisent dans les follicules. Dans la zone médullaire, on trouve des plasmocytes, des LB, et des macrophages. On retrouve également des macrophages dans la zone subcapsulaire.

III.2. Trafic ganglionnaire des LB

Les cellules stromales sont des composants clés pour la structure des organes lymphoïdes secondaires et interagissent étroitement avec les lymphocytes en leur servant de support pour leur recrutement et pour leur migration. Elles sont donc importantes pour la régulation de la circulation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires.

A la recherche d'antigènes étrangers, les lymphocytes circulent du sang vers le ganglion et retournent dans le sang via la lymphe. Cette circulation continue des lymphocytes est essentielle pour la surveillance immunitaire. En 1959, James Gowans a été le premier à démontrer que les lymphocytes circulent continuellement du sang vers les organes lymphoïdes secondaires et reviennent dans le sang [60]. Les lymphocytes peuvent entrer dans le ganglion via les vaisseaux lymphatiques afférents ou à travers des vaisseaux sanguins spécialisés appelés HEV qui sont les sites majeurs de recrutement des lymphocytes dans le ganglion (**Fig. 19**).

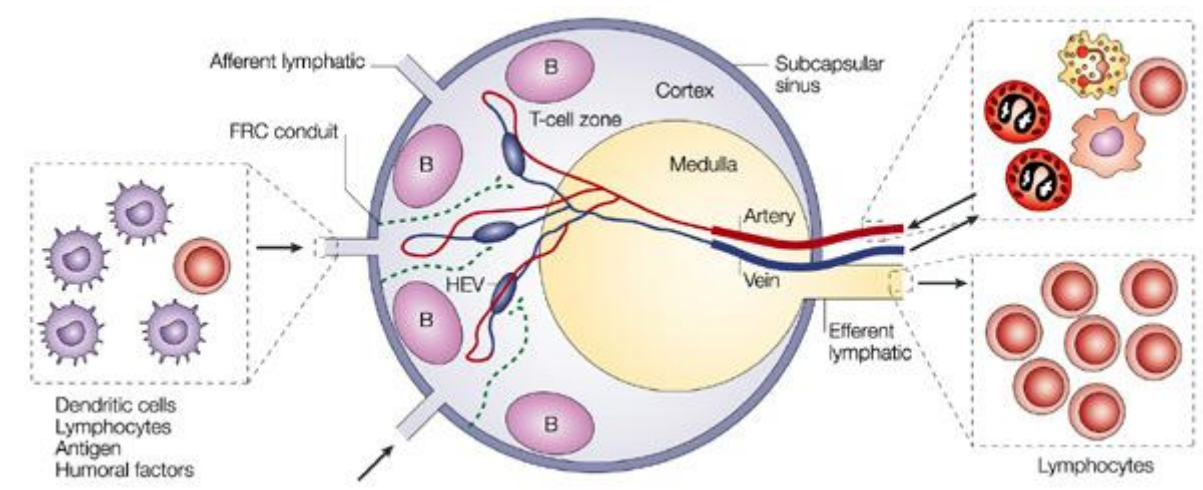


Figure 19 : Recirculation des lymphocytes entre le sang, le ganglion et la lymphe. Masayuki Miyasaka and Toshiyuki Tanaka, Nat Rev Immunol. 2004 [61]. Parmi les cellules du sang qui arrivent dans le ganglion via les artères afférents, les lymphocytes sont capables de pénétrer dans le ganglion via les HEV et de sortir via les vaisseaux lymphatiques efférents.

Une fois dans le ganglion, les LT migrent vers la zone T dans le paracortex, alors que les LB migrent vers les follicules dans le cortex. Si les lymphocytes ne rencontrent pas d'antigènes durant leur séjour dans le ganglion, ils quittent ce dernier via les vaisseaux lymphatiques efférents. L'ensemble des processus impliqués dans l'entrée des lymphocytes dans le ganglion, dans leur trafic intra-ganglionnaire et dans leur sortie du ganglion seront détaillés dans ce chapitre.

III.2.1. Entrée des lymphocytes dans la zone paracorticale : homing ganglionnaire

III.2.1.1. Les HEV : portes d'entrée des lymphocytes dans le ganglion

Adjacente à la zone B ou follicule, la zone T ou zone paracorticale contient des HEV qui sont des vaisseaux capillaires spécialisés qui fournissent continuellement des lymphocytes au ganglion (**Fig. 20**). Les HEV sont constituées de cellules endothéliales particulières qui expriment des récepteurs qui lient les lymphocytes et facilitent leur transmigration dans le réseau réticulaire [62]. Les HEV sont localisées dans le cortex interfolliculaire et le paracortex et perdent leur fonction de HEV à partir de la jonction cortico-médullaire en se transformant en veinules médullaires.

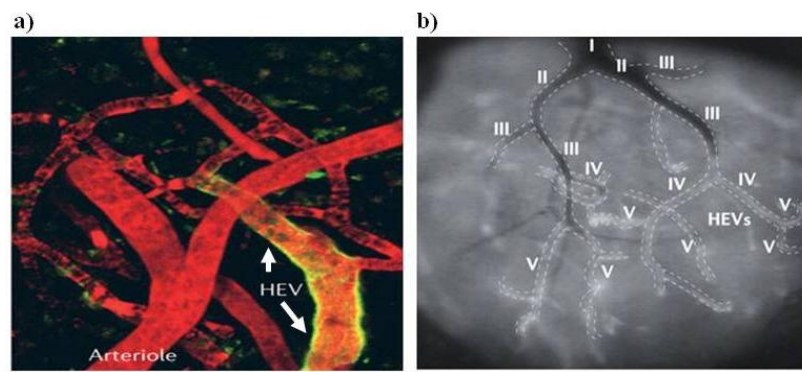


Figure 20 : (a) Visualisation des vaisseaux sanguins (en rouge) et des HEV (en vert). (b) Visualisation d'un réseau de HEV dans le paracortex. Girard JP et al. Nat Rev Immunol. 2012 [63].

III.2.1.2. Les étapes du homing ganglionnaire

Les lymphocytes naïfs entrent dans le ganglion par un processus appelé « homing » qui implique une cascade de processus d'adhésions [64] permettant aux lymphocytes d'adhérer, de migrer à travers et de traverser les cellules endothéliales des HEV. Le processus de homing ganglionnaire est bien caractérisé et peut être détaillé en trois étapes importantes : le roulement (**rolling**), l'arrêt (**sticking**) et la **transmigration** des lymphocytes (**Fig. 21**).

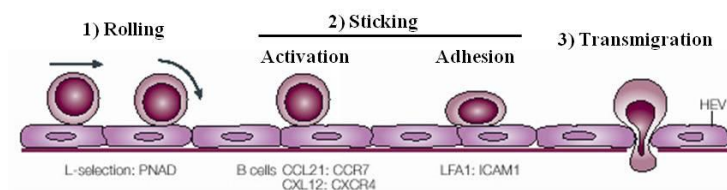


Figure 21 : Les grandes étapes impliquées dans le homing des lymphocytes dans le ganglion et les facteurs membranaires impliqués. von Andrian UH et Mempel TR. Nat Rev Immunol. 2003 [65].

III.2.1.2.1. Le roulement des lymphocytes (le Rolling) : Rôle du CD62L

L'interaction des lymphocytes avec les **cellules endothéliales des HEV** est initiée par le récepteur de homing, la L-sélectine (**CD62L**) qui permet l'attachement et le roulement des lymphocytes le long des HEV [66] (**Fig. 22**). La L-sélectine reconnaît son ligand **PNAd** (peripheral lymph node addressin) qui fait partie de la famille des o-glycanes sulfatés, exprimé par les cellules endothéliales des HEV et facilite ainsi le **roulement** (rolling) des lymphocytes en augmentant leur contact avec les cellules endothéliales. Cette interaction permet une adhésion faible des lymphocytes qui favorise leur roulement le long des cellules endothéliales des HEV.

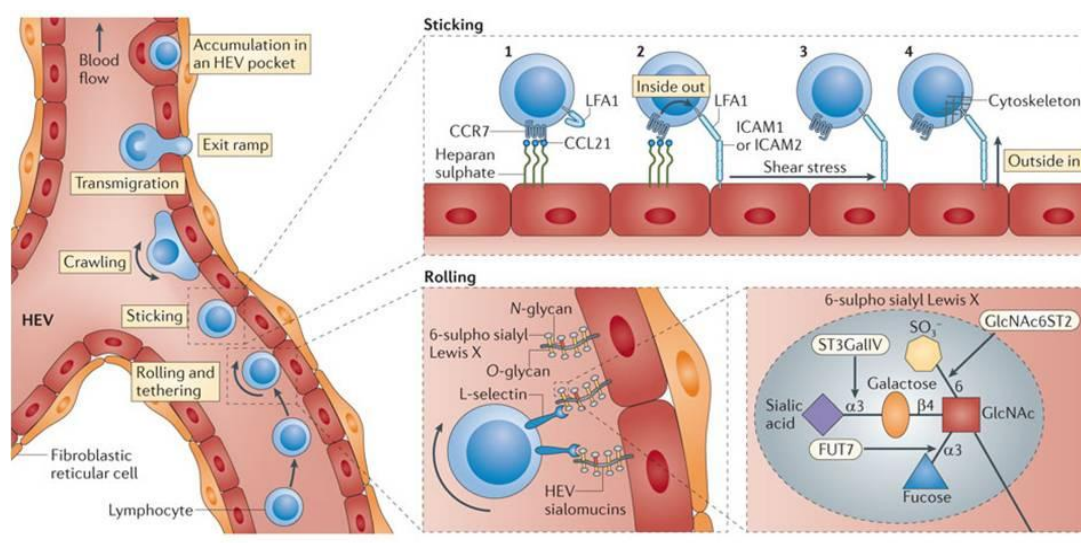


Figure 22 : Interactions moléculaires impliquées dans le rolling et le sticking des LB le long des cellules endothéliales lymphatiques. Girard JP et al. Nat Rev Immunol. 2012 [63].

III.2.1.2.2. L'arrêt des lymphocytes (le sticking) : rôle du CCR7, du CXCR4 et du CXCR5

L'arrêt (sticking) des lymphocytes le long de l'endothélium des HEV est crucial pour leur migration à travers les cellules endothéliales et est provoqué par une série d'interactions moléculaires. (1) L'interaction entre les chimiokines **CCL21 (SLC)** et **CCL19 (ELC)**, retrouvées dans la lumière des HEV [67, 68] et retenues à la surface par des glycosaminoglycanes (GAG) à héparanes sulfates (**Fig. 22**), et leur récepteur **CCR7** exprimé par les lymphocytes active notamment l'intégrine **LFA-1** exprimée par les lymphocytes [69]. (2) LFA-1 activée se lie à ses ligands **ICAM-1** ou **ICAM-2** à la surface des cellules endothéliales, permettant (3 et 4) une adhésion forte aux cellules endothéliales et l'arrêt des lymphocytes. Même si les LT montrent de meilleures capacités de migration en réponse au

CCL21 que les LB [67], le récepteur CCR7 joue un rôle important dans le homing des lymphocytes et donc dans leur entrée via les HEV dans le ganglion [70].

Cependant, les récepteurs **CXCR4** (récepteur du CXCL12) et **CXCR5** (récepteur du CXCL13) jouent également un rôle dans le homing des lymphocytes. En effet, il a été montré que tout comme le CCR7, le CXCR4 est impliqué dans l'attachement des lymphocytes aux cellules endothéliales des HEV via son interaction avec le CXCL12 retrouvé dans la lumière des HEV et que cet effet est plus important pour les LB que les LT [71]. De plus ce travail a montré que dans le cas des LB, le CXCR5 est également impliqué dans l'entrée des LB à travers les HEV des plaques de Peyer qui expriment sélectivement le CXCL13.

En conclusion, les récepteurs **CCR7** et **CXCR4** sont impliqués dans l'entrée des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires et notamment le ganglion, à travers les HEV, alors que le **CXCR5** est impliqué spécifiquement dans l'entrée des LB dans les plaques de Peyer.

III.2.1.2.3. L'extravasation des lymphocytes

Les LT naïfs expriment le CCR7 (récepteur du CCL19 et du CCL21) et le CXCR4 (récepteur du CXCL12) alors que les LB naïfs expriment ces deux récepteurs et le CXCR5 (récepteur du CXCL13). Comme décrit précédemment, les HEV expriment CCL21, CXCL12 et spécifiquement dans les plaques de Peyer, le CXCL13. L'extravasation des lymphocytes se réalise par un mécanisme de diapédèse à travers les jonctions inter-endothéliales mais le rôle des chimiokines dans ce phénomène n'est pas clair [65]. Les GAG à héparanes sulfates endothéliales jouent un rôle crucial dans la rétention et la présentation de CCL21 aux lymphocytes [72]. Les lymphocytes qui traversent les HEVs par transcytose entrent dans le ganglion et rentrent en contact avec le réseau de FRC riche en CCL21 qui se trouve autour des HEV dans le parenchyme [73].

Il est à noter que la plupart des cellules myéloïdes expriment la L-sélectine et LFA-1, mais pas CCR7 et CXCR4. Ces cellules peuvent donc effectuer le homing, mais ne peuvent pas s'arrêter pour pénétrer dans le ganglion via les HEV [65].

III.2.2. Compartimentation des lymphocytes au sein du ganglion

Après leur entrée au niveau du paracortex du ganglion via les HEV, les lymphocytes T et B migrent vers des compartiments distincts : **la zone paracorticale** pour les LT et les **follicules** pour les LB (**Fig. 23a**).

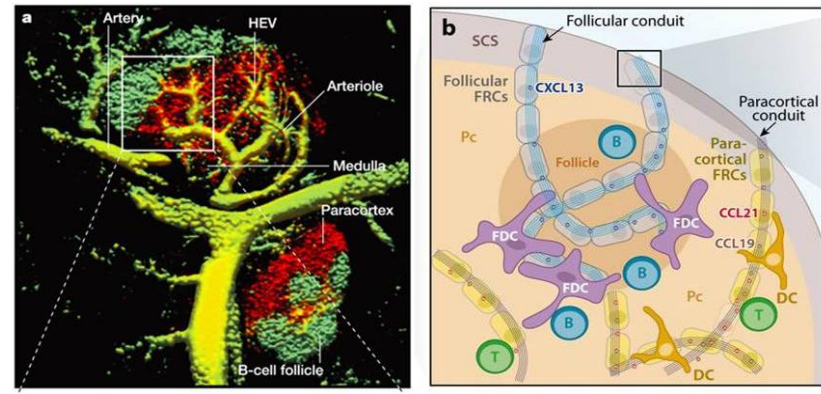


Figure 23 : (a) Visualisation de la compartimentation des LB (en vert) dans les follicules et des LT (en rouge) dans le paracortex. von Andrian UH et Mempel TR. Nat Rev Immunol. 2003 [65]. **(b) Représentation des FRC qui se divisent en conduits folliculaires dans les follicules ou conduits paracorticaux dans le paracortex et localisation des chimiokines CXCL13, CCL19 et CCL21 sécrétées dans ces différentes zones.** Gonzalez SF, et al. Annu Rev Immunol. 2011 [74].

Le paracortex et les follicules contiennent un réseau de conduits de collagène appelés conduits paracorticaux dans le paracortex et conduits folliculaires dans les follicules. Ces conduits sont composés de FRC paracorticaux dans le paracortex et de FRC folliculaires dans les follicules. Les **LB** sont attirés vers les follicules par le **CXCL13** sécrété par les **FDC** et les **FRC folliculaires**, alors que les LT migrent vers la zone T, en fonction du gradient de CCL19 et CCL21 sécrétées par les FRC paracorticales (**Fig. 23b**).

III.2.2.1. Le réseau réticulaire : véritables voies de circulation des lymphocytes

Le **réseau réticulaire** est un réseau poreux, spongieux, composé de FRC qui occupent entièrement le ganglion et notamment le paracortex. Les FRC ont un large noyau ovale et irrégulier et un cytoplasme qui forme des prolongements appelés interstices. Les interstices ont une largeur allant de 10 à 20 μ m, permettant aux lymphocytes de se déplacer le long de ces prolongements. Les lymphocytes migrent en adhérant et en se glissant le long de la surface des FRC qui leur servent de voies de circulation [73].

Les FRC sécrètent des filaments minces de matrice extracellulaire appelés **fibres réticulaires** (**Fig. 24a**). Les fibres réticulaires sont composées d'un noyau de fibrilles de collagène enveloppé par une

couche de membrane basale [75]. Les composants des fibres réticulaires incluent : les collagènes de type I, III et IV ; l'élastine, l'entactine, la fibronectine, la laminine, la tenascine, la vitronectine, et l'héparane sulfate [76].

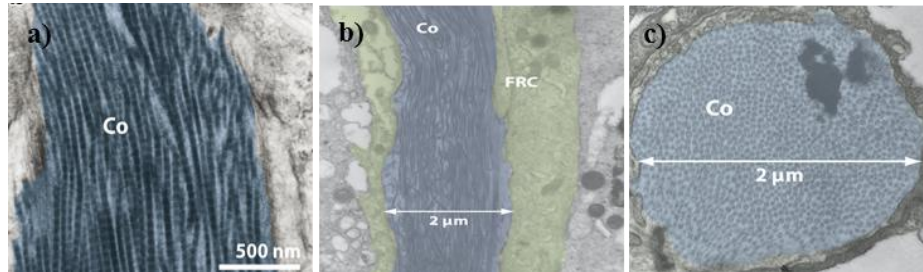


Figure 24 : (a) Coupe longitudinale d'un conduit réticulaire. (b) Espace entre les fibres de collagène à l'intérieur des conduits. (c) Coupe transversal d'un conduit réticulaire. Co = Conduit ; FRC = Follicular Reticular cell. Gonzalez SF, et al. Annu Rev Immunol. 2011 [74].

Les FRC forment une enveloppe autour des fibres réticulaires et les enferment dans des tubes cytoplasmiques qui couvrent 90% de la surface des fibres réticulaires ce qui protège les lymphocytes d'un contact direct avec la matrice extracellulaire [77] (**Fig. 24b, c**). Ce tubule cytoplasmique et les fibres réticulaires forment un système de **conduits** dont le diamètre interne mesure 1 à 2 μm qui permettent la circulation de petites molécules telles que des antigènes solubles et des chimiokines [78].

III.2.2.2. Migration des LT vers la zone T et des LB vers les follicules

Après leur entrée dans le ganglion, les LT qui expriment le **CCR7** migrent ensuite le long des réseaux de FRC réticulaires en réponse à un gradient des chimiokines **CCL21** et **CCL19** [79]. CCR7 et ses ligands CCL21 et CCL19 sont aussi importants pour la rétention des LT dans la zone paracorticale. En effet, des cellules T déficientes en CCR7 sortent plus rapidement du ganglion que des LT wild-type [80]. Les couples CCR7/CCL21 et CCR7/CCL19 sont donc importants pour la régulation du trafic des LT dans le ganglion, en permettant leur entrée, leur mobilité et leur compartimentation, ainsi que leur rétention dans le ganglion.

Quant aux LB, après avoir quitté la zone des HEV, ils migrent le long du réseau de FRC réticulaires pour rejoindre les follicules [73]. Ce mouvement des LB vers les follicules dépend de l'expression du récepteur **CXCR5** à leur surface et de la sécrétion de **CXCL13** par les FDC qui se trouvent dans les follicules [81].

III.2.3. Migration intra-folliculaire des LB : rôle des récepteurs CXCR5 et EBI2

Les follicules contiennent la plus grande population de **LB** dans le ganglion. Ils sont également riches en **FDC** qui expriment les molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 ainsi que les récepteurs du complément. Les FDC ont une origine mésenchymateuse et sont différentes des CD classiques. Ce sont des cellules stromales spécialisées qui capturent les antigènes et les présentent aux LB dans les follicules. Dans les follicules, les LB sont en mouvement constant à la recherche d'antigènes présentés par les FDCs et par les macrophages, ou d'antigènes solubles amenés par les conduits [82].

Le couple de chimiokine/récepteur CXCL13-CXCR5 est essentiel pour l'attraction des LB dans la zone folliculaire. Dans cette zone, le CXCL13 est produit par les FDCs qui se situent en profondeur dans les follicules et par les MRC qui se situent près de la zone subcapsulaire [83]. Le CXCR5, exprimé par les LB, permet leur migration dans les follicules selon une trajectoire aléatoire [84]. Ils migrent au sein des follicules le long des prolongements cytoplasmiques des FDCs [73], mais peuvent également migrer le long de conduits formés par les MRC, qui expriment également CXCL13 [83].

Cependant, le CXCL13 n'est pas la seule chimiokine impliquée dans la régulation de la migration des LB vers les follicules. Cette observation vient du fait que des cellules B de souris déficiente en CXCR5 ou en CXCL13 se localisent quand même dans les follicules. **EBI2** (GPR183), le récepteur de la chimiokine **EBI2L** qui est exprimée dans les LB matures, joue également un rôle dans la migration des LB dans vers les follicules [85-87]. La source de production d'EBI2L n'est pas clairement connue, mais serait localisée en dehors des follicules et dans les zones interfolliculaires. Le récepteur EBI2 dirige ainsi la position des LB dans les zones périfolliculaire et interfolliculaire (migration entre deux follicules).

III.2.4. Sortie des lymphocytes du ganglion

III.2.4.1. Les sinus paracorticaux : portes de sortie des lymphocytes du ganglion

Le parenchyme ganglionnaire est entouré par un réseau de **sinus lymphatiques** (Fig. 25). Les sinus lymphatiques sont bordés par une couche de LEC qui sont peu différentes des cellules endothéliales des HEV, mais qui expriment des marqueurs caractéristiques tels que la podoplanine [88], le récepteur LYVE-1 (Lymphatic vessel Endothelial HA receptor 1) [89] et le **récepteur au mannose** [90].

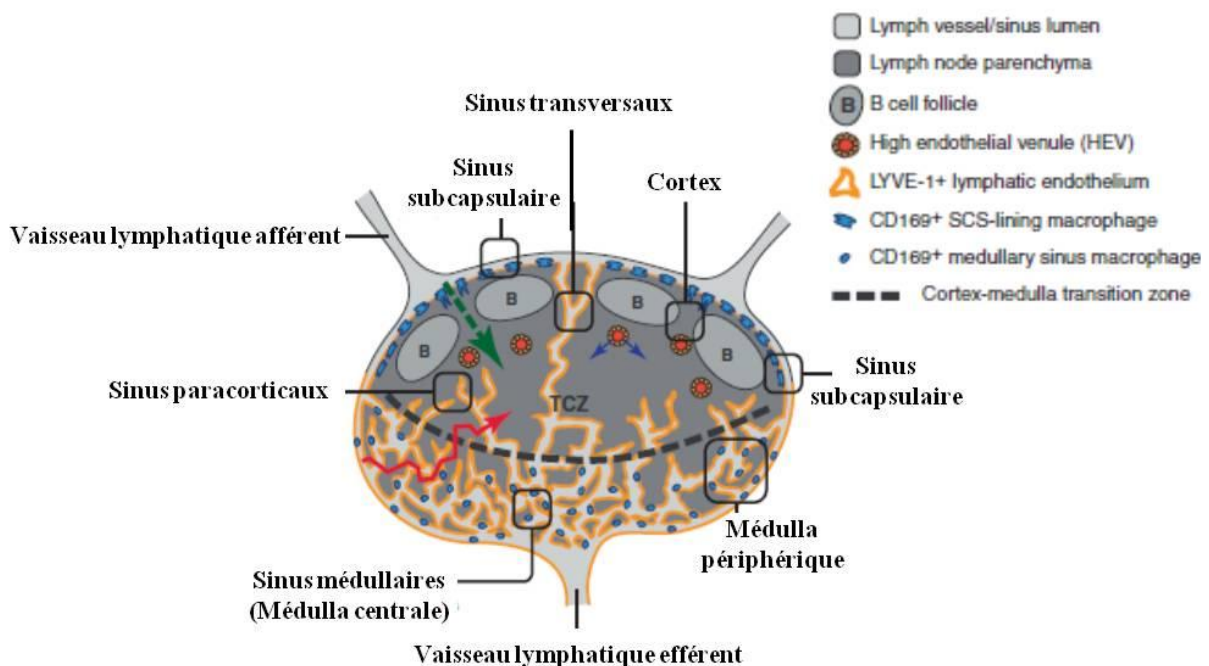


Figure 25 : Dessin représentant le réseau de sinus lymphatiques au sein du ganglion. Föster R. et al. Trends Immunol. 2012 [91].

On distingue le sinus subcapsulaire qui est connecté aux vaisseaux lymphatiques afférents et qui entoure les lobules ganglionnaires, les sinus paracorticaux qui constituent un labyrinthe lymphatique dans le paracortex, les sinus médullaires dans la médulla et les sinus transversaux qui connectent directement le sinus subcapsulaire aux sinus médullaires.

Les sinus paracorticaux situés à l'interface entre les follicules et le paracortex sont connectés aux sinus médullaires qui sont eux même connectés aux vaisseaux lymphatiques efférents [92]. La sortie des lymphocytes du ganglion se fait via les **sinus paracorticaux** large d'environ 100µm et ce processus nécessite au préalable la traversée de l'endothélium lymphatique qui borde les sinus.

Une fois à l'intérieur de ces sinus, les LB traversent la zone corticale et arrivent dans les sinus médullaires (**Fig. 26**), puis quittent le ganglion via le vaisseau lymphatique efférent.

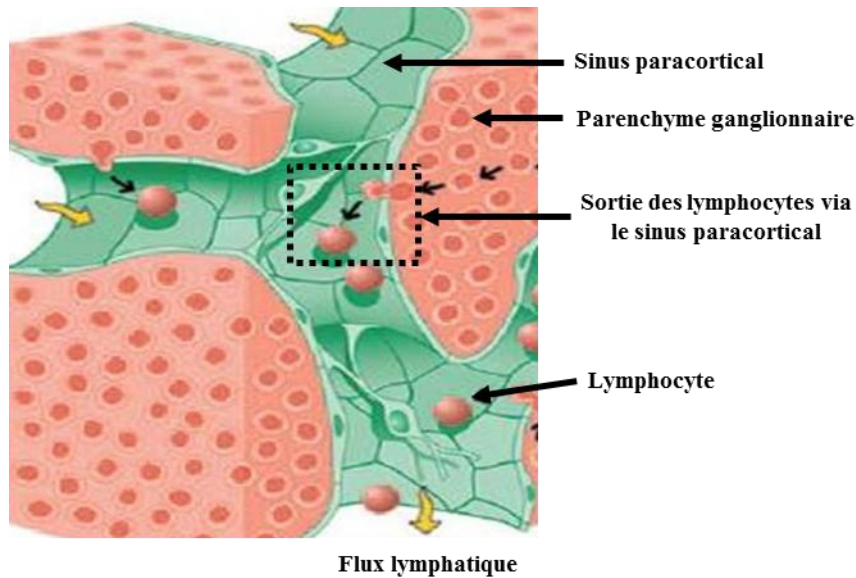


Figure 26 : Sortie des lymphocytes via les sinus lymphatiques paracorticaux par transmigration. Ohtani O, Ohtani Y. Arch Histol Cytol. 2008 [93].

III.2.4.2. Régulation de la sortie des lymphocytes du ganglion

III.2.4.2.1. Rôle du récepteur *S1P1* et de son ligand *S1P*

Le rôle du **récepteur 1 de la Sphingosine-1-Phosphate (S1P1)** dans la sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'un immunomodulateur synthétique, le **FTY720** (Fingolimod). Des études *in vivo* réalisées chez le rat ont montré que cette molécule entraîne une diminution drastique du nombre de lymphocytes circulants et augmente leur nombre dans le ganglion [94]. FTY720 est phosphorylable par la sphingosine kinase 2 (SphK2) et sa forme phosphorylée est capable de se lier à 4 des 5 récepteurs de la Sphingosine-1-Phosphate (S1P) dont S1P1, exprimé par les LT et LB et d'induire une downrégulation de l'expression de S1P1 à la surface cellulaire [95, 96]. Ainsi, *in vivo*, une diminution de S1P1 induite par l'action de FTY720 pourrait expliquer l'accumulation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires induite par cette drogue, suggérant un rôle de S1P1 dans la sortie des lymphocytes du ganglion.

En accord avec ces données, il a été montré que l'expression de S1P par les lymphocytes est cruciale pour leur sortie des organes lymphoïdes secondaires qui se fait selon un **gradient de concentration** de son ligand **S1P** [97, 98]. En effet, il existe un gradient de concentration de S1P entre le sang, les organes lymphoïdes secondaires et la lymphe (**Fig. 27**).

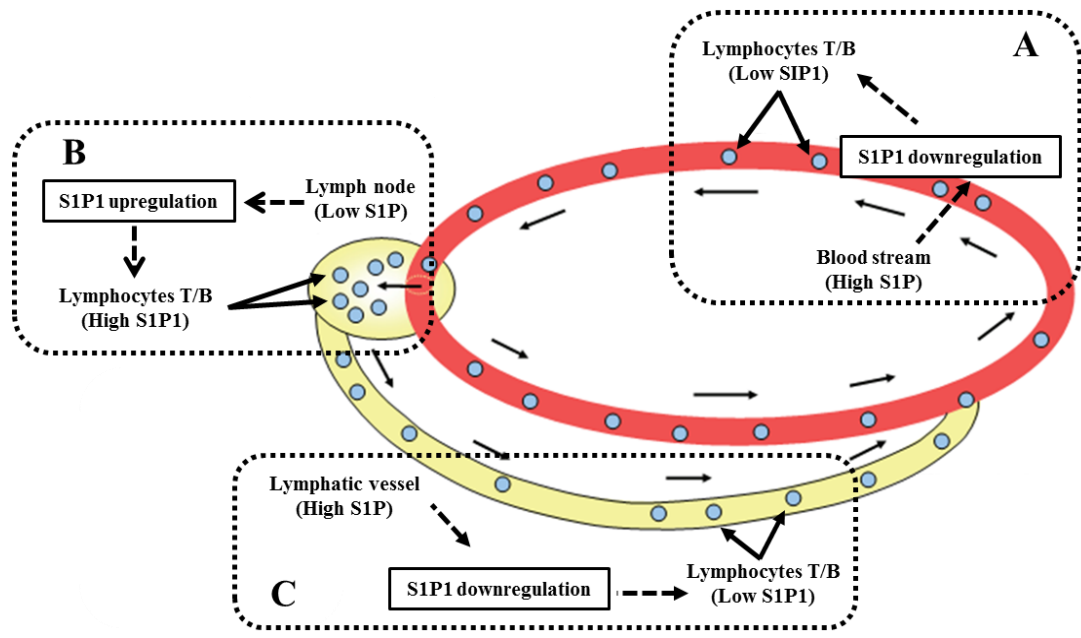


Figure 27 : Circulation des lymphocytes et modulation de l'expression de S1P membranaire. (A) Downrégulation de S1P dans le sang. (B) Uprégulation de S1P dans le ganglion. (C) Downrégulation de S1P dans les vaisseaux lymphatiques. Modifié d'après Chiba K et al. Cell Mol Immunol. 2006 [99].

Du fait d'une forte concentration de S1P dans le sang et la lymphe, l'expression de S1P est downrégulée dans les lymphocytes circulants (**Fig. 27A et C**). Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires qui expriment un faible taux de S1P (**Fig.27B**), l'expression de S1P augmente pour faciliter leur sortie du ganglion via les sinus paracorticaux [100, 101]. De ce fait, lors de la recirculation des lymphocytes, S1P est down-régulé dans le sang, puis up-régulé dans le parenchyme du ganglion, et ensuite down-régulé dans la lymphe [102]. Ce gradient de S1P et ce cycle de l'expression de S1P sont importants pour la recirculation continue des lymphocytes.

III.2.4.2.2. Rôle de la L-sélectine (CD62L) et du CXCR4

Le CD62L, exprimé par les lymphocytes, est un médiateur clé pour l'entrée des lymphocytes dans le ganglion via les HEV à travers sa liaison au PNA^d (Chap. III.2.1.2.1). Une unique étude a montré que le **CD62L** permet l'adhésion des lymphocytes aux cellules endothéliales lymphatiques des vaisseaux lymphatiques du ganglion via son interaction avec et le **récepteur au mannose** des cellules

endothéliales lymphatiques [90]. La sortie des lymphocytes du ganglion nécessite la traversée de l'endothélium lymphatique des sinus paracorticaux. Dans ce contexte, ces résultats suggèrent un rôle potentiel du CD62L dans la sortie des lymphocytes du ganglion. Cependant aucune expérimentation *in vivo* n'a pour l'heure permis de répondre à cette hypothèse.

Le CXCR4 joue un rôle dans l'entrée des lymphocytes dans le ganglion (Chap. III.2.1.2.2), mais également dans la sortie des LB naïfs des plaques de Peyer [103] et dans la migration des plasmocytes vers les cordes médullaires du ganglion (chapitre III.3.3).

III.3. Maturation des LB dans les follicules ganglionnaires : rôle de la stimulation antigénique

Une fois les processus de maturation terminés, les LB matures naïfs qui expriment un BCR fonctionnel (**Fig. 28a**) quittent la moelle osseuse via des vaisseaux sanguins, atteignent la circulation périphérique et migrent vers le ganglion qui est le lieu de la maturation finale des LB. Les processus de maturation des LB naïfs dépendent de l'interaction et de l'activation des LB par les antigènes qui arrivent par la lymphe dans les follicules. Si les LB ne rencontrent pas d'antigènes dans les follicules, ils quittent le ganglion via les vaisseaux lymphatiques efférents et meurent au bout de quelques jours [74]. Dans le cas contraire, l'activation des LB est initiée par la reconnaissance d'un antigène spécifique par le BCR. Après l'activation des LB par un antigène dans les follicules, ils présentent l'antigène en association avec le CMH de classe II à des LT heppers CD4⁺ qui stimulent leur prolifération (**Fig. 28b**). La prolifération des LB donne naissance à une structure spécialisée appelée centre germinatif, composée de lymphocytes B activés qui prolifèrent rapidement dans les réseaux de FDC. Au sein de ces structures, les LB se différencient en LB mémoires et en plasmocytes. L'ensemble des processus de **stimulation antigénique**, **d'activation des LB par les LT helpers (LTh)** et de **maturation des lymphocytes dans les centres germinatifs** seront détaillés dans ce chapitre.

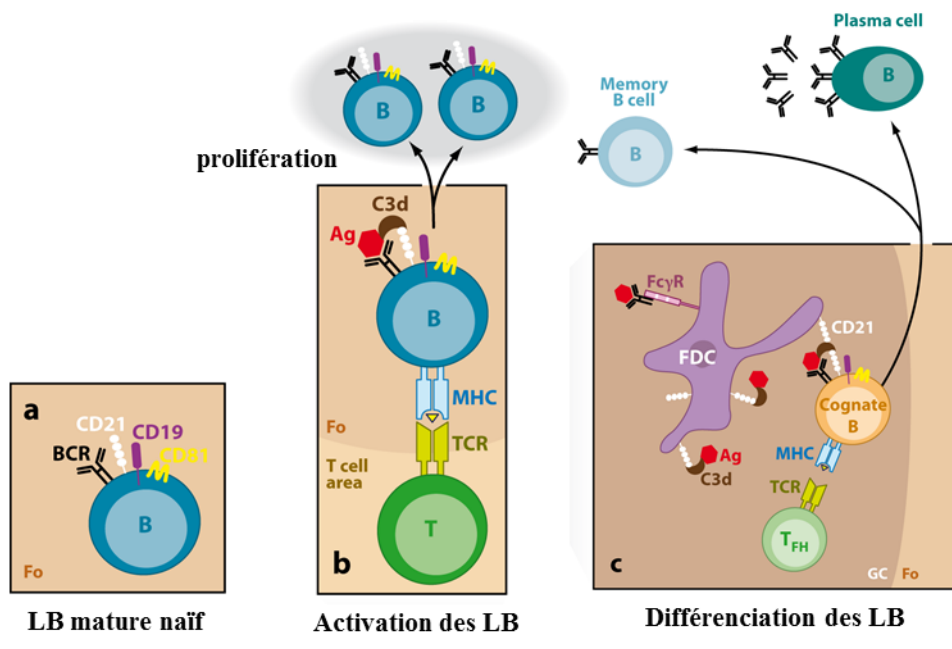


Figure 28 : Processus de maturation des LB : (a) LB mature naïf dans un follicule (Fo). (b) Stimulation des LB par les LT à l'interface entre le follicule et le paracortex (T cell area). (c) Maturation des LB dans le centre germinatif (GC), différenciation en LB mémoires et en plasmocytes. Gonzalez SF, et al. Annu Rev Immunol. 2011 [74].

III.3.1. Circulation des antigènes dans le ganglion

Les antigènes sont drainés par la lymphe et accèdent au sinus sub-capsulaire (SSC) du ganglion par les vaisseaux lymphatiques afférents. Une couche de macrophage sub-capsulaire (MSC) borde le SSC et empêche la diffusion passive des antigènes de grandes tailles (>70kDa) dans les follicules qui sont le lieu de la rencontre des LB avec les antigènes. Ces antigènes de grandes tailles qui sont le plus souvent des complexes immuns ou des particules virales sont capturés dans le SSC par les MSC qui les présentent ensuite aux LB dans les follicules (Chap. III.3.2.1). En revanche, des antigènes solubles de petites tailles (<70kDa) peuvent pénétrer dans les follicules de manière passive en utilisant deux processus (**Fig. 29**).

a) Premièrement, la microscopie électronique a permis d'identifier des pores d'environ 0,1-1 μ m de diamètre au niveau des SSC qui sont adjacents aux follicules. Ces pores permettraient aux antigènes de petite taille de passer directement dans les follicules où se trouvent les LB [104].

b) Deuxièmement, comme décrit précédemment (Chap III.2.2.1), il existe dans la zone folliculaire un réseau de conduits folliculaires qui ont une ouverture directe dans le SSC. Ces conduits dont le diamètre interne mesure entre 1 et 2 μ m permettent la circulation de molécules de petites tailles telles que les petits antigènes [82].

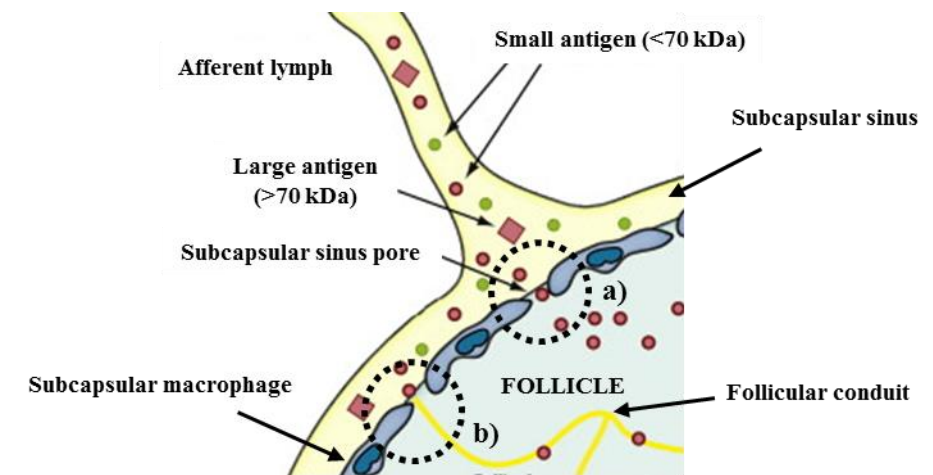


Figure 29 : Entrée des antigènes de petite taille (<70 kDa) dans les follicules ganglionnaires. (a) Passage des antigènes de petites tailles à travers les pores subcapsulaires. (b) Circulation des antigènes de petites tailles dans les conduits folliculaires. Modifié d'après Harwood NE, Batista FD. *Immunity*. 2009 [105].

Enfin, les antigènes (de petite ou de grande taille) peuvent circuler directement via les SSC vers les sinus médullaires où ils sont détruits par les macrophages médullaires qui ont une plus forte activité phagocytaire que les MSC.

III.3.2. Stimulation antigénique : présentation de l'antigène et activation des LB

III.3.2.1. Présentation de l'antigène aux LB par les CPA dans les follicules

Des données suggèrent que la stimulation du BCR par les antigènes associés à la membrane des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) est plus importante pour l'activation *in vivo* des LB que la stimulation du BCR par les antigènes libres [106, 107]. Ainsi, même si dans les follicules, les LB peuvent rencontrer des antigènes solubles qui passent à travers les pores au niveau des SSC ou à travers les conduits folliculaires, leur **activation** par les CPA et notamment les FDC qui présentent des antigènes de grande taille est plus probable (Fig. 30).

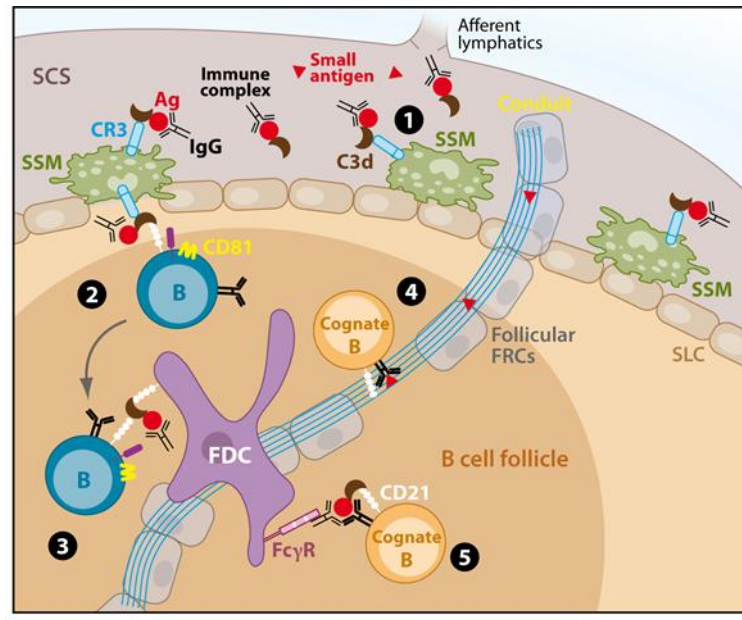


Figure 30 : Présentation des antigènes aux LB par les FDC. Gonzalez SF, et al. Annu Rev Immunol. 2011 [74]. (1) Dans le sinus subcapsulaire (SSC), les complexes immuns sont capturés par les macrophages subcapsulaires (SSM). (2) Les complexes immuns sont transférés aux LB naïfs non spécifiques qui les transportent dans les follicules. (3) Les complexes immuns sont transférés aux cellules dendritiques folliculaires (FDC). Les LB spécifiques interagissent via leur BCR avec les antigènes de petite taille (4) ou les complexes immuns présentés par les FDC (5).

Des antigènes de grande taille et notamment des complexes immuns qui entrent dans le ganglion via les vaisseaux lymphatiques afférents sont capturés par les MSC qui ont une activité phagocytaire limitée. Ceci leur permet de retenir des antigènes intacts à leur surface et de les présenter aux LB non spécifiques. Les MSC participent ainsi à l'accumulation rapide des complexes immuns, dans le SSC et constituent une source d'approvisionnement en antigène pour les LB.

Les complexes immuns présentés aux LB non spécifiques par les MSC sont transférés aux FDC plus en profondeur dans les follicules. Cela constitue une voie alternative d'approvisionnement en complexes immuns pour les FDC qui sont considérées comme étant les principales CPA des LB dans les organes lymphoïdes secondaires et qui jouent donc un rôle majeur dans la stimulation antigénique.

III.3.2.2. Stimulation du BCR et activation des LB par les CPA

III.3.2.2.1. Le récepteur B à l'antigène (BCR)

La stimulation des LB se réalise par la reconnaissance d'un antigène spécifique par le récepteur B à l'antigène des LB (**BCR**). Le BCR est un complexe protéique constitué par une Immunoglobuline membranaire (mIg) composée de deux **chaînes lourdes** (Heavy chain) identiques et de deux **chaînes légères** (Light chain) identiques reliées par des ponts dissulfures, associée à un hétérodimère composé d'une **Ig α** (CD79a) et d'une **Ig β** (CD79b) (**Fig. 31a et b**).

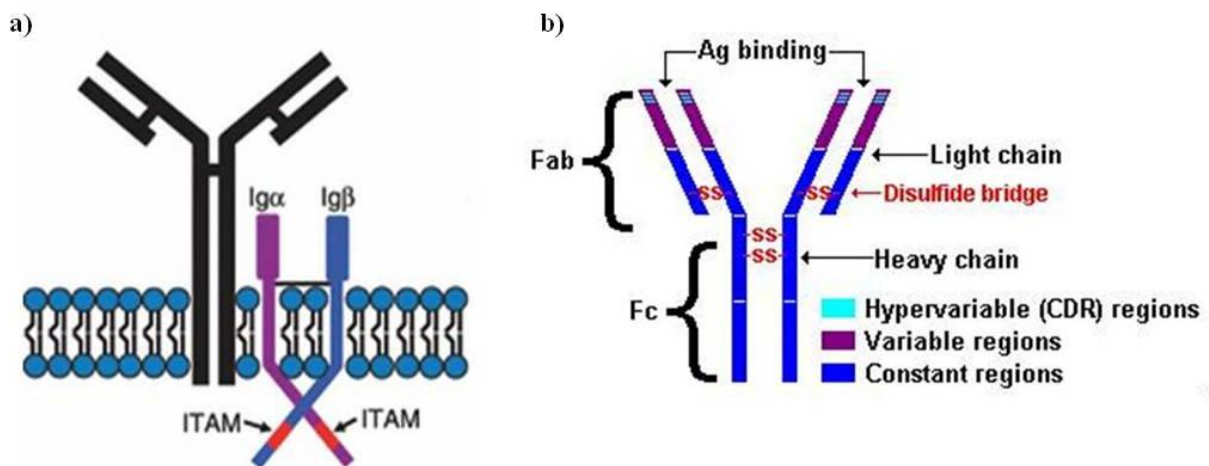


Figure 31 : (a) Structure du récepteur B à l'antigène (BCR). (b) Représentation des différentes régions au sein d'une immunoglobuline. Modifié d'après Kurosaki T, Hikida M. Immunol Rev. 2009 [108].

Le BCR peut être composé d'une Ig de classe M (IgM) constituée de chaînes lourdes de type μ ou d'une Ig de classe D (IgD) constituée de chaînes lourdes de type δ . Les chaînes légères peuvent être de type κ ou λ . L'Ig présente une région constante, une région variable et une région hypervariable. La région hypervariable est segmentée en trois régions appelées CDR (Complémentary Determining Region), CDR1, CDR2, et CDR3 qui sont responsables de la spécificité de liaison de l'antigène. Les Ig α et Ig β contiennent un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) qui initie la transduction du signal induit par la liaison d'un antigène au BCR.

III.3.2.2.2. Stimulation et initialisation de la signalisation du BCR

La reconnaissance d'un antigène spécifique par le BCR est la première étape dans l'**initiation de la signalisation** et l'**activation des LB**. La signalisation du BCR est initiée par la phosphorylation des motifs **ITAM** par les protéines kinase de la famille **Src**, telles que Lyn, Fyn, Blk ou Lck [109]. Par ailleurs la signalisation du BCR est contrôlée par des protéines phosphatase telles que le CD22 et le CD45 qui régulent négativement l'activation des LB. Il existe de ce fait un **équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation** qui joue un rôle important dans l'activation des LB. Deux modèles permettent d'expliquer les mécanismes d'initiation de la signalisation du BCR dans les LB activés par des antigènes.

Le premier modèle d'activation des LB en réponse à la stimulation du BCR souligne l'importance de l'équilibre de phosphorylation régulé par la présence de protéine kinase Src et de protéines phosphatase à proximité du BCR dans des structures appelées **microcluster** (**Fig. 32**).

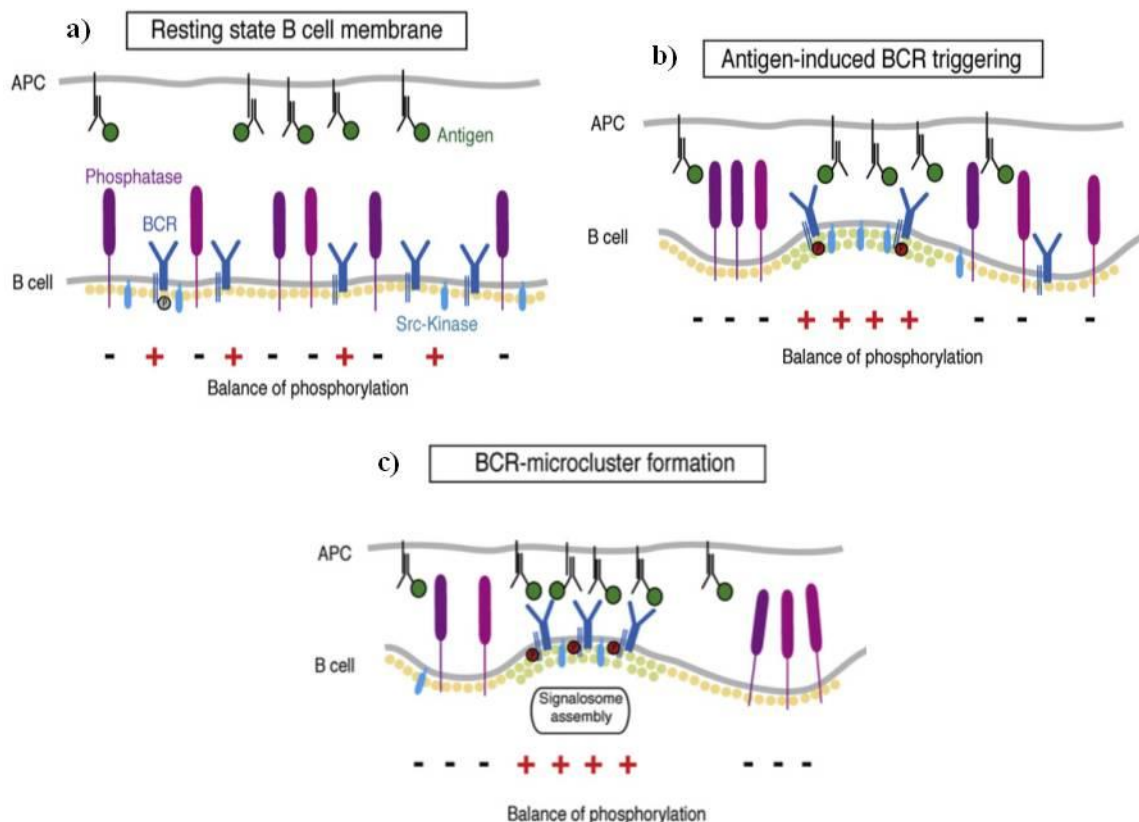


Figure 32 : Formation des microclusters lors de l'initiation de l'activation du BCR. Harwood NE et Batista FD. Immunity. 2008 [110].

Le BCR des lymphocytes au repos diffuse librement le long de la membrane et se localise à proximité des phosphatases ou des kinases de manière aléatoire. L'état de phosphorylation/déphosphorylation est à l'équilibre et ne permet pas l'initiation de la signalisation (**Fig. 32a**).

Le contact avec les antigènes présentés par les CPA permet une réorganisation du cytosquelette qui favorise l'accumulation des BCR et des Kinases Src dans une zone de contact étroit (microcluster) qui exclue les phosphatases. L'agrégation du BCR aboutit ensuite à la phosphorylation des motifs ITAM par les kinases Src (**Fig. 32b**).

Ces microclusters forment des sites potentiels pour la formation d'un signalosome résultant de l'accumulation et l'activation de molécules de signalisation. Ce signalosome initie une cascade de signalisation (Chap. III.3.2.2.3) qui régule l'expression de gènes, la réorganisation du cytosquelette, ou l'internalisation des complexes BCR-antigène (**Fig. 32c**).

Le deuxième modèle met l'accent sur l'importance des radeaux lipidiques dans la formation des microclusters de BCR qui sont nécessaire pour l'activation des LB (**Fig. 33**).

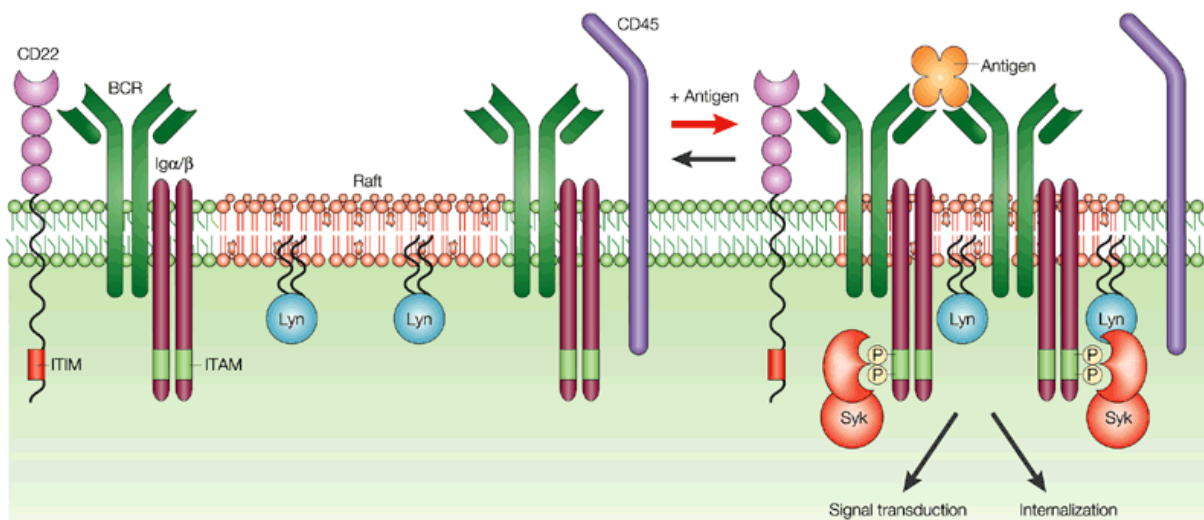


Figure 33 : Rôle des radeaux lipidiques (rafts) dans l'initiation de l'activation du BCR. Pierce SK. Nat Rev Immunol. 2002 [111].

La surface cellulaire contient des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en shingolopide appelés **Radeaux lipidiques (rafts)** qui servent de plateforme pour la signalisation et le trafic de récepteurs [112]. Les protéiques kinases Lyn se concentrent dans les rafts alors que les phosphatases CD22 et CD45 ainsi que le BCR en sont exclus. La liaison d'un antigène provoque

l'oligomérisation du BCR qui se déplace alors vers les rafts où il est phosphorylé par Lyn et initie une cascade de signalisation et la formation du signalosome.

III.3.2.2.3. Voies de signalisation activées en aval du BCR

La liaison de l'antigène initie en aval du BCR, une cascade de phosphorylations et d'activations de molécules appartenant à plusieurs voies distinctes mais fortement inter-connectées. Aux cours du développement, la signalisation du pré-BCR est cruciale pour la formation et l'expression du BCR mature à la surface des lymphocytes B (Chap. II.2.3.1). Ces signaux conduisent également à l'activation, à la prolifération et à la différenciation des LB matures (Chap. III.3.3) et représente la pièce centrale dans l'élaboration de la réponse immune humorale.

Parmi les voies de transduction du signal activées en aval du BCR (**Fig. 34**) figurent:

*Les voies impliquant les **petites protéines G***

*La voie de la **PLC γ 2** et la libération du **Ca²⁺** intracellulaire*

*les voies dépendantes des **PKC***

*La voie de la **PI3K***

a) Les voies impliquant les petites protéines G

La protéine adaptatrice BLNK peut s'associer avec la protéine adaptatrice Grb2. Grb2 recrute Sos, le facteur d'échange de nucléotide à guanine qui active Ras, une petite protéine G. Ras activé (Ras-GTP) interagit avec la kinase Raf-1 et l'active. Cette dernière active à son tour la voie des MAP kinase, MEK_{1/2}/ERK_{1/2}. ERK_{1/2} activé pénètre ensuite dans le noyau et active des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire tels que c-Myc et Elk-1.

La protéine Vav est une protéine multifonctionnelle qui peut être recrutée *via* ses domaines SH3 au PIP3 membranaire et *via* ses domaines SH2 à différents adaptateurs de signalisation dont BLNK. L'interaction de Vav avec BLNK permet à la kinase Syk de phosphoryler et d'activer Vav. A son tour, Vav va activer les petites protéines G Rac1 et Rac2. Rac1 est un important médiateur de la polymérisation de l'actine et de la réorganisation du cytosquelette en réponse à la stimulation du BCR. Rac2 est quant à elle indispensable pour l'adhésion des lymphocytes B à ICAM-1 et pour la formation de la synapse immunologique [113]. Les protéines Rac sont capables d'activer les kinases JNK_{1/2} (c-Jun NH2-terminal kinases) ainsi que la p38 MAP kinase. Ces deux protéines migrent ensuite dans le noyau et induisent la phosphorylation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression des gènes de la prolifération et de la survie cellulaire tels que c-Jun ou ATF-2.

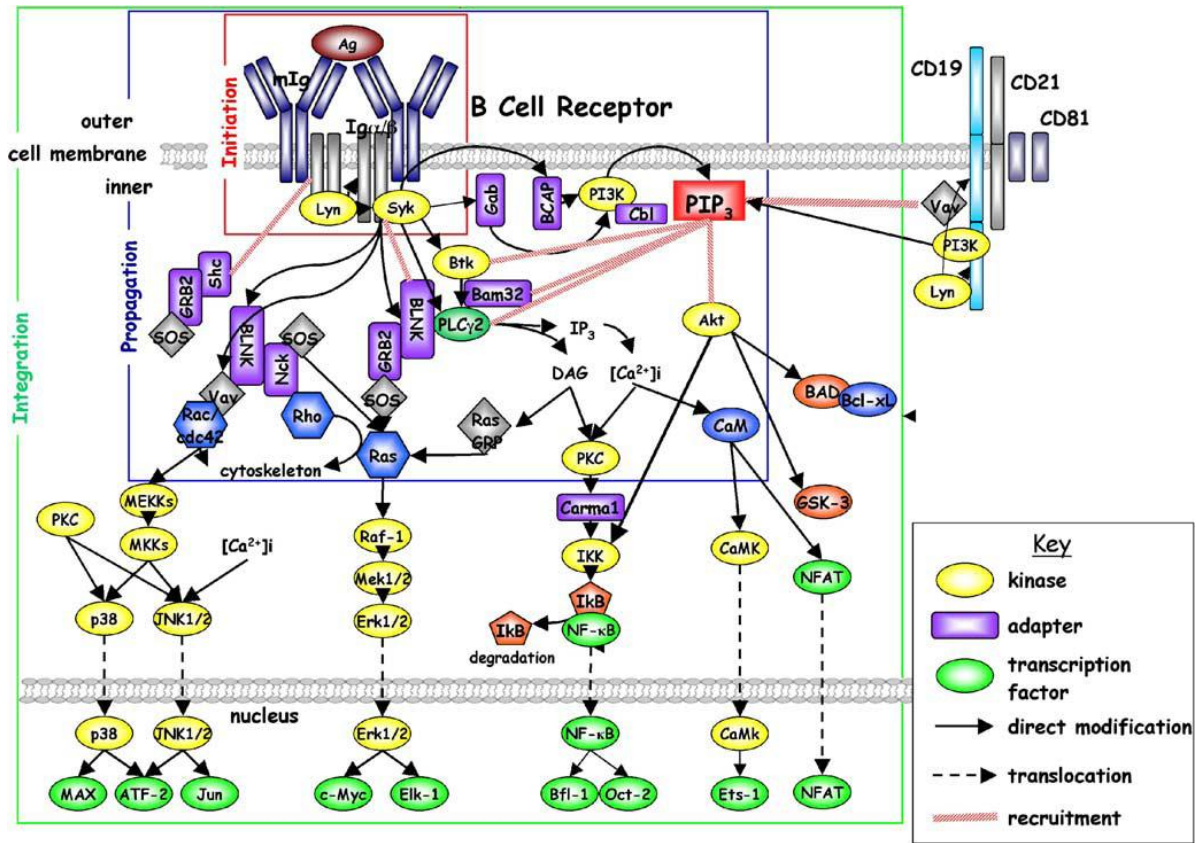


Figure 34 : Principales voies de signalisation activées en réponse à la stimulation du BCR. La phase d'initiation du signal correspond à des événements proximaux du BCR (phosphorylation des ITAMs par Lyn, recrutement de Syk). La phase de propagation du signal correspond principalement à la formation de complexes autour d'adaptateurs de signalisation. La phase d'intégration du signal correspond à l'activation d'intermédiaires de signalisation puis à celle de facteurs de transcription. Dal Porto JM et al. Mol Immunol. 2004 [114].

b) La voie de la PLC γ 2 et de la libération du Ca $^{2+}$ intracellulaire

La phosphorylation de la protéine adaptatrice BLNK entraîne le recrutement à la membrane de la PLC γ 2 et de la tyrosine kinase Btk et cette dernière est alors activée par phosphorylation *via* Syk associée à BLNK. Le rapprochement de la PLC γ 2 et de la kinase Btk activée permet ensuite à cette dernière d'activer la PLC γ 2 par phosphorylation, ouvrant ainsi la voie de l'hydrolyse du Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate (PIP2) en Diacylglycérol (DAG) et en Inositol 1,4,5- triphosphate (IP3).

L'IP3 stimule les récepteurs IP3R de la membrane du réticulum endoplasmique et permet la libération du calcium stocké, entraînant une augmentation intracellulaire du calcium.

L'activation du facteur de transcription NFAT est une des plus importantes cibles de la voie de signalisation calcique [115]. Le Ca $^{2+}$ active la phosphatase Calcineurine en se liant à sa sous-unité calmoduline. La déphosphorylation de NFAT cytoplasmique par la calcineurine entraîne son activation et sa translocation dans le noyau.

Les cellules B expriment trois des cinq membres de la famille NFAT (NFAT-1 à NFAT-3) et tous les trois sont activés en réponse au BCR *via* la voie de signalisation calcique.

c) Les voies dépendantes des PKC

Le Diacylglycerol (DAG), produit de l'hydrolyse du PIP2 par la PLC γ 2, conduit à l'activation des membres de la famille des protéines Kinase C (PKC). La famille des PKC regroupent 10 isoformes de protéines sérine/thréonine kinases, classées en 4 sous-groupes: les PKC classiques ou conventionnelles (α , β I, β II, γ), les PKC nouvelles (δ , ϵ , θ) et les PKC atypiques (ζ , λ /i). Cette classification repose leur mécanisme d'activation. Les PKC conventionnelles (cPKC) sont activées à la fois par le DAG, le Ca²⁺ et la phosphatidyl-sérine (PS). Les PKC nouvelles (nPKC) sont activées uniquement par le DAG et la PS tandis que les PKC atypiques (aPKC) ne sont activée que par la PS. Certaines isoformes « apparentées aux PKC », comme la PKC μ et la PKC ν ont été récemment regroupés dans une autre famille de sérine/thréonine kinase dénommée Protein Kinase D (PKD). Cette famille regroupe 3 membres : la PKD1/PKC μ , la PKD2 et la PKD3/PKC ν [116].

En réponse à la stimulation du BCR, les PKCs subissent une translocation du cytoplasme vers la membrane cellulaire puis elles vont activer un grand nombre d'effecteurs de la signalisation intracellulaire.

L'activation des PKCs conduit à l'activation de la voie classique Ras/Raf-1/MEK/ERK.

L'isoforme PKC β semble être l'isoforme principalement requise pour l'activation de NF κ B en réponse à la stimulation du BCR [116]. La PKC γ se lie à la protéine adaptatrice CARMA-1. La phosphorylation de CARMA-1 par la PKC γ favorise son recrutement dans les radeaux lipidiques et son oligomérisation. CARMA-1 recrute alors Bcl-10 et il s'ensuit une série de recrutement et d'activation de protéines conduisant séquentiellement à l'activation du complexe IKK, à la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B par ce complexe puis à la translocation nucléaire de NF κ B.

La PKC β peut aussi phosphoryler Btk et inhiber son activité selon un mécanisme de « feed-back » négatif [117].

L'isoforme PKC δ exerce une action régulatrice négative sur la signalisation du BCR et elle semble particulièrement importante pour maintenir la tolérance des lymphocytes B envers les antigènes du soi. La PKC θ régule de façon générale l'activation de JNK et de NF- κ B mais cette isoforme est peu exprimée dans les lymphocytes B [118].

d) La voie PI3K-Akt

Parmi les différentes isoformes de PI3K, l'expression de la PI3K δ est restreinte aux cellules hématoïétiques. La PI3K δ joue un rôle important dans la fonction, la prolifération et la survie des LB. L'activation de la voie PI3K est dépendante de la protéine transmembranaire CD19 qui est à la fois un marqueur de surface des lymphocytes B matures et un co-récepteur du BCR. La stimulation du BCR va entraîner la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique du CD19. Ces tyrosines phosphorylées vont alors servir de point d'ancrage à la sous-unité p85 de la PI3K conduisant à l'activation de la PI3K et à sa translocation vers les microdomaines membranaires riches en PIP2 [119]. La PIP2 va alors être phosphorylé en phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3) sous l'action de la PI3K, entraînant le recrutement à la membrane et l'activation de nombreuses protéines contenant des domaines de type Pleckstin Homology (PH) telles que les protéines Akt, GSK-3, PLC γ 2, Btk, Rac1 et la Phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1).

L'état de proximité qui en résulte permet à la kinase PDK1 de phosphoryler et d'activer la protéine kinase Akt. La protéine Akt contribue à l'activation de NFAT et cette activation contribue à l'entrée des cellules en division. Par ailleurs, Akt active la serine/thréonine-kinase GSK-3 (glycogène-synthase kinase 3) et il est clairement établi que la voie PI3K/Akt/GSK3 joue un rôle central dans la stimulation du cycle cellulaire et dans l'augmentation de la survie cellulaire en agissant sur des facteurs de transcription comme FOXO1 [120]. Enfin, la phosphorylation des protéines pro-apoptiques Bad par Akt maintient les protéines anti-apoptiques Bcl2 et Bcl-XL à l'état actif, favorisant par voie de conséquence la survie cellulaire.

III.3.2.3. Internalisation de l'antigène par les LB et présentation aux LT helpers

Après la stimulation du BCR par un antigène présenté par les CPA dans le follicule, les LB activés up-régulent l'expression membranaire de CCR7 [121] et migrent vers la zone T pour être stimulés par les LTh. Alors que les LT activés dans le paracortex par les CD up-régulent CXCR5 pour leur permettre de répondre au CXCL13 exprimé par les FDC des follicules et donc migrer vers cette zone à la rencontre des LB activés [122].

Dans ce contexte, l'activation du BCR conduit à la formation d'une synapse dynamique à la surface cellulaire qui permet sa diffusion de la membrane facilitant ainsi l'assimilation des antigènes et leur présentation aux LTh selon une cascade d'évènements illustrés dans la **figure 35**.

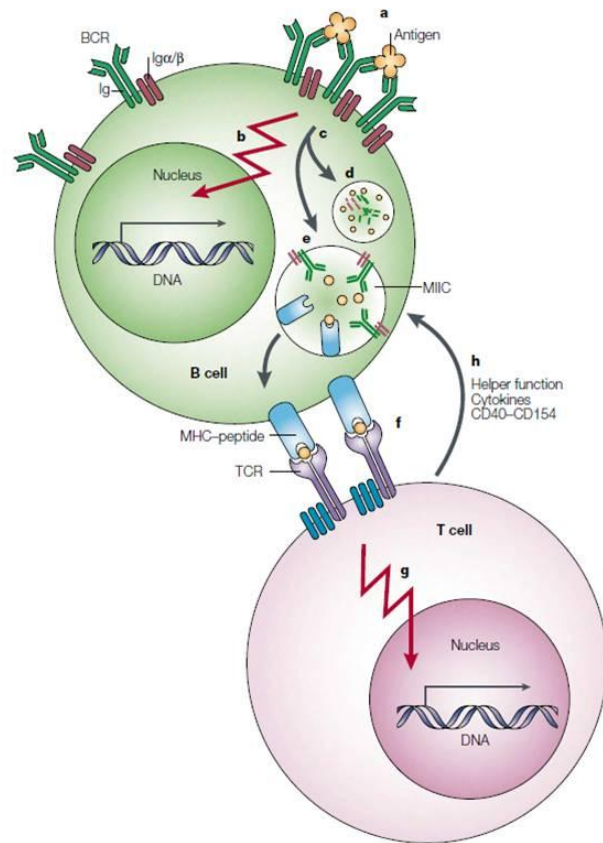


Figure 35 : Internalisation et présentation de l'antigène aux LT helpers : rôle du BCR et du CMHII. Pierce SK. Nat Rev Immunol. 2002 [111].

L'activation du BCR par un antigène (a) conduit à l'activation de voies de signalisation décrites précédemment (b) et à l'internalisation du complexe antigène-BCR (c). Ce complexe est ensuite soit dégradé (d), soit intégré dans un complexe endosomal nommé MIIC (e). Dans cet endosome, les épitopes issus de la dégradation de l'antigène internalisé se lient aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Le **complexe antigène-CMHII** sera ensuite adressé à la membrane des LB et les épitopes seront présentés au récepteur T à l'antigène (**TCR**) des LTh CD4+ (f), conduisant à leur activation (g). L'activation des LTh par les LB constitue une aide pour l'activation complète des LB qui est indispensable pour leur maturation finale. En effet, les LT activés fournissent aux LB des signaux qui sont requis pour leur prolifération et leur maturation. Ces signaux sont délivrés à travers des molécules de surface et des cytokines sécrétées par les LTh (h). Enfin, l'engagement du CMHII permet l'interaction du **CD40** exprimé à la surface des LB avec son ligand le **CD40L** (ou CD154) exprimé à la surface des LT CD4+. Cette interaction conduit à la prolifération des LB et à la formation dans les follicules des **centres germinatifs** (CG) qui sont les lieux de **différenciation** en **LB mémoire** et en **plasmocytes**.

III.3.3. Maturation et différenciation des LB dans le centre germinatif

D'un point de vue immunohistochimique, le **CG** est divisé en une **zone sombre** qui contient majoritairement des LB qui prolifèrent, appelés **centroblastes** et une **zone claire** qui contient des cellules non-proliférantes appelées **centrocytes**. Les CG sont des microenvironnements spécialisés où se déroule l'expansion clonale, le switch de classe des Ig, l'hypermutation somatique (HMS) et la maturation d'affinité du BCR. Le modèle traditionnel propose que dans la zone sombre les centroblastes subissent l'expansion clonale, le Switch de Classe et l'HMS [123]. Dans la zone claire où se trouvent des antigènes retenus par des **FDC** et des **LTh folliculaires**, les centrocytes sont sélectionnés en fonction de la reconnaissance du BCR avec les antigènes présentés [124]. Ce processus appelé maturation d'affinité permet de sélectionner les LB qui expriment un BCR de haute affinité pour l'antigène. En effet, les centrocytes pour lesquels l'activation par les FDC et les LTh ne conduit pas à la génération de signaux de survie meurent par apoptose et sont éliminés par des macrophages. Ceux qui réussissent avec succès cette sélection antigénique migrent vers la zone sombre ou sortent du CG et se différencient soit en LB mémoires, soit en précurseurs de plasmocytes de longue durée de vie. Le centre germinatif atteint sa taille maximale après deux semaines et disparaît progressivement après plusieurs semaines.

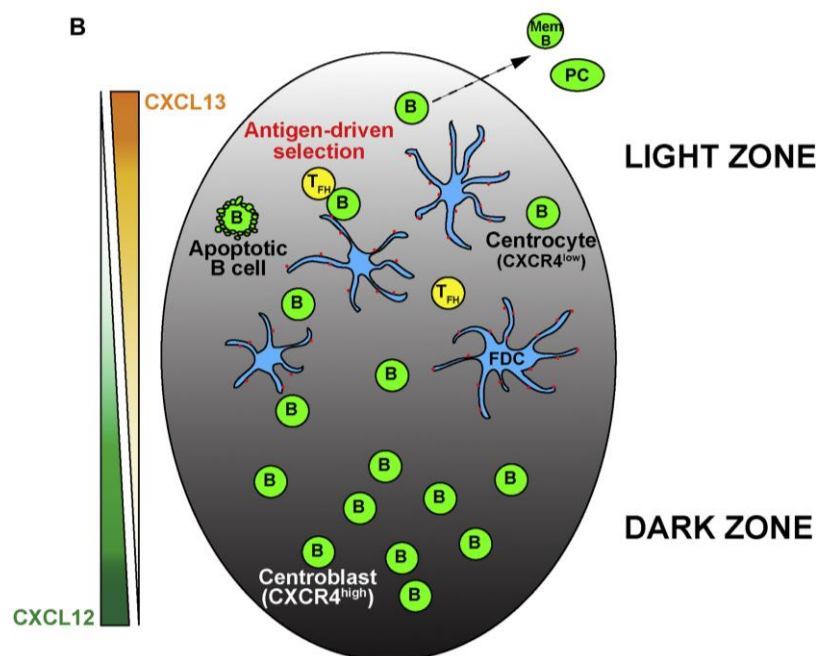


Figure 35 : La compartimentation des LB dans le centre germination est contrôlée par les couples CXCL12-CXCR4 et CXCL13-CXCR5. Gatto D, Brink R. J Allergy Clin Immunol. 2010 [125].

Les LB migrent entre les zones sombre et claire et prolifèrent dans ces deux zones [126]. Une régulation de l'expression des récepteurs de chimiokines dans les follicules et le centre germinatif permet de contrôler cette mobilité dynamique au sein des CG.

Les FDC de la zone claire expriment CXCL13 et le stroma de la zone sombre exprime CXCL12. Ceci permet aux LB qui ont des stades de maturation différentes de migrer en fonction de l'expression de CXCR5 et de CXCR4. Les centroblastes **uprégulent** l'expression de **CXCR4**, leur localisation dans la zone sombre dépend ainsi de CXCR4 alors que les centrocytes migrent dans la zone claire via CXCR5. Ainsi, la compartimentation des centroblastes et des centrocytes dépend de l'abondance différentielle en CXCL13 et CXCL12 dans les zones sombre et claire et de la régulation du récepteur CXCR4 par les centroblastes et les centrocytes [127].

Enfin, en se différenciant en **plasmoblastes**, les LB **downrégulent CXCR5** et **uprégulent CXCR4** [128], ce qui leur permet de migrer vers les cordes médullaires où CXCL12 est sécrété en abondance [129]. Une fois dans la zone médullaire, les plasmoblastes se différencient en plasmocytes qui sécrètent des anticorps dans la lymphe. Hargreaves D.C. et al. ont montré en 2001 que dans la rate, contrairement au ganglion, le CXCR4 est important pour la distribution et la localisation des plasmocytes [129]. Cependant, il a été montré en 2003 chez la souris que des plasmoblastes CXCR4^{-/-} ne se localisent pas dans la zone médullaire du ganglion, contrairement aux plasmocytes CXCR4^{+/+}. Ces résultats montrent ainsi, le rôle déterminant du CXCR4 dans la localisation des plasmoblastes dans la zone médullaire du ganglion [130].

IV. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) : un modèle pathologique d'étude du microenvironnement médullaire et ganglionnaire

La présentation dans les deux premiers chapitres des microenvironnements médullaire et ganglionnaire servent de base pour la compréhension de leur rôle dans la physiopathologie de la LLC que l'on considère ici comme étant un modèle pathologique de microenvironnement. Ce troisième chapitre souligne l'importance de l'interaction des LB-LLC avec les différentes cellules stromales dans les processus de survie et de prolifération des LB-LLC au sein des centres prolifératifs de la moelle et du ganglion. Une attention particulière sera portée sur l'expression et le rôle des récepteurs de chimiokines CXCR4, CXCR5 et CCR7 dans l'attraction et la rétention des LB-LLC dans ce microenvironnement. La dérégulation du BCR et ses conséquences dans la physiopathologie de la LLC seront également présentées. Enfin, les approches thérapeutiques ciblant le microenvironnement de la LLC feront l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

IV.1. La LLC est une pathologie dépendante du microenvironnement

La LLC est caractérisée par une expansion clonale et une accumulation progressive de **lymphocytes B CD5+ matures** (lymphocytes B de LLC, LB-LLC) dans le **sang**, la **moelle** et les **organes lymphoïdes secondaires**.

Les **LB-LLC** du sang périphérique sont bloqués en phase G0/G1 du cycle cellulaire [131] et montrent un programme de mort cellulaire défectueux, ce qui favorise leur survie *in vivo*. La LLC se définit de ce fait par une accumulation de LB matures qui ont échappé au programme de mort cellulaire et qui sont arrêtés en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Ces LB ont une activité proliférative faible, ce qui conforte l'idée qu'*in vivo*, un défaut d'apoptose favoriserait leur accumulation. Ce défaut d'apoptose peut s'expliquer par la surexpression dans les LB-LLC de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [132, 133], alors que des protéines pro-apoptotiques telles que Bcl-xS sont sous-exprimées [134]. L'ensemble de ces données démontre que des caractéristiques intrinsèques présentes dans les LB-LLC favoriseraient un **défaut d'apoptose *in vivo*** de ces cellules.

Cependant, contrairement aux observations faites *in vivo*, les cellules de LLC subissent une **apoptose spontanée *in vitro***. Cette apoptose *in vitro* est temporairement bloquée quand les cellules sont mises en contact avec des cellules stromales issus de la moelle. Ainsi, même si les LB-LLC ont des caractéristiques intrinsèques leur permettant de survivre *in vivo*, les **cellules stromales du microenvironnement** constitueraient un support non négligeable pour leur **survie *in vivo***.

Enfin, des analyses de la longueur des télomères [135] et des analyses de la dynamique cellulaire *in vivo* des LB-LLC [136] montrent que dans les compartiments médullaire et ganglionnaire, les LB-LLC ont un turnover beaucoup plus dynamique que dans le compartiment sanguin. En effet, chez certains patients, un renouvellement de 0,1-1% de la population de LB-LLC est observé chaque jour. En accord avec ces données, il a été observé au sein du ganglion et dans une moindre mesure, au sein de la moelle, des sites particuliers appelés **centres prolifératifs ou pseudo-follicules** qui favorisent la **prolifération** et la **survie des LB-LLC** [137], par des mécanismes impliquant leur contact direct avec des cellules du microenvironnement.

IV.2. Interaction des LB-LLC avec les cellules du microenvironnement

Dans le microenvironnement, le contact direct des LB-LLC avec les LT, les cellules stromales mésenchymateuses (MeSC), les cellules endothéliales, les FDC et les macrophages, qui leur fournissent une variété de stimuli, entraîne l'activation de voies de signalisation spécifiques impliquées dans l'**activation cellulaire**, la **prolifération** et la **survie cellulaire (Fig. 37)**.

Nous développerons dans ce chapitre l'interaction des LB-LLC avec les **MeSC**, les **NLC** et les **LT**. Ces interactions font le plus souvent intervenir une phase d'attraction des LB-LLC par chimiotactisme suivie d'une phase d'interaction via notamment des molécules de surface qui permet l'induction de signaux de survie dans les LB-LLC.

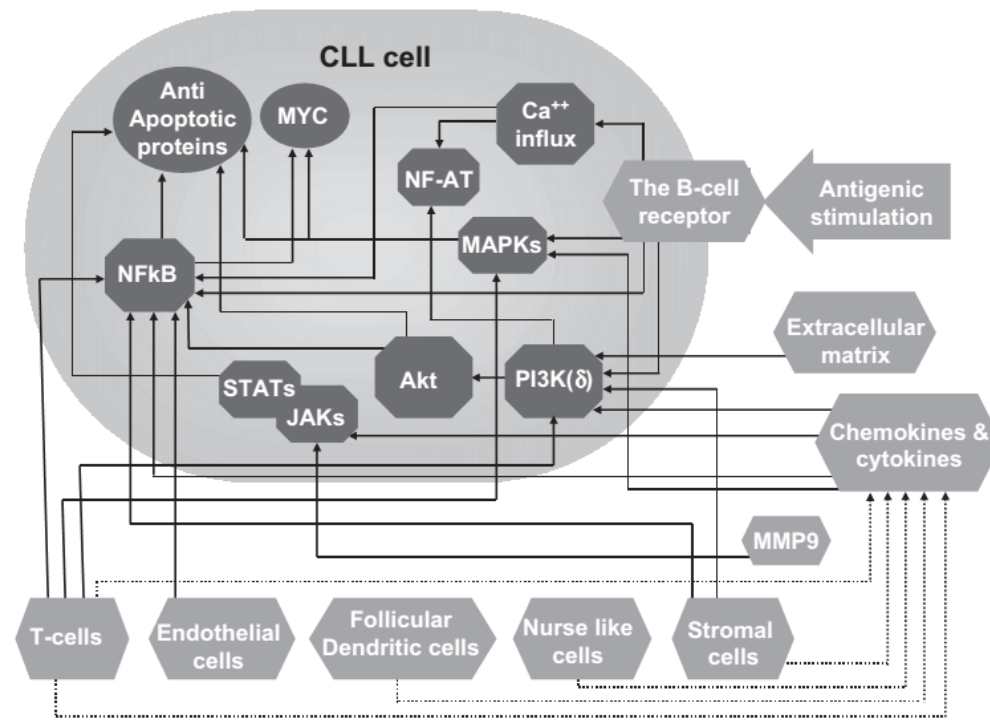


Figure 37 : Interaction des LB-LLC avec le microenvironnement. Herishanu Y et al. Hematol Oncol Clin North Am. 2013 [138].

IV.2.1. Interaction avec les cellules stromales mésenchymateuses (MeSC)

Dans la moelle, l'hématopoïèse normale dépend des cellules MeSC qui servent de sites d'attachement et qui fournissent des facteurs de croissance nécessaires au développement des précurseurs hématopoïétiques. Les MeSC sécrètent le **CXCL12**, un facteur important pour l'attraction des LB-LLC mais également pour leur survie (**Fig. 38.1**). De plus une étude *in vitro* a montré que la co-culture des LB-LLC avec ces cellules stromales de la moelle les protège de l'apoptose spontanée par des mécanismes qui dépendent de leur contact direct avec les cellules stromales [139].

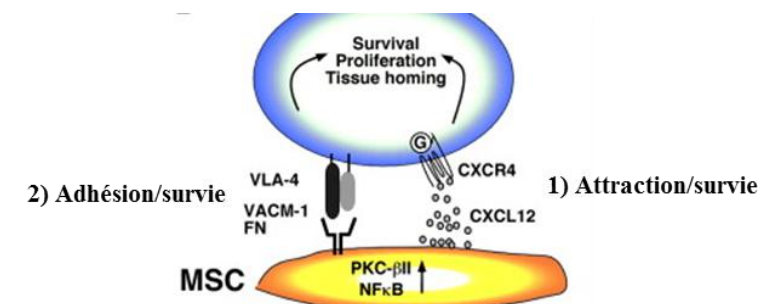


Figure 38 : Interaction des LB-LLC avec les MeSC. MSC = Mesenchymal Stromal Cell. Modifié d'après Burger JA, and Gribben JG. Semin Cancer Biol. 2013 [140].

Ce contact se réalise via la liaison de l'intégrine $\alpha4\beta1$ (CD49d/CD29 ou **VLA-4**) exprimée par les LB-LLC, à son ligand **VCAM-1** exprimé à la surface des MSC ou aux composants de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine (**FN**), sécrétés par les cellules stromales et permet l'induction de signaux de survie (**Fig. 38.2**) [141].

IV.2.2. Interaction avec les Nurse Like Cells (NLC) *in vitro* ou les macrophages *in vivo*

La culture prolongée (14 jours) *in vitro* de PBMC issus de patients LLC entraîne leur différenciation en de larges cellules adhérentes CD68+, appelées nurse-like cells (**NLC**) [142, 143]. Ces NLC qui ont un phénotype de cellules fibroblastiques et qui expriment le marqueur de cellules souches mésenchymateuses STRO-1, représentent un bon modèle d'étude *in vitro* des interactions entre LB de LLC et les **macrophages CD68+** *in vivo* [144]. La différenciation des NLC à partir de monocytes dépend de leur contact avec les LB-LLC [143]. En effet les monocytes purifiés à partir de patients LLC et co-cultivés avec des LB-LLC se différencient en NLC, alors que leur co-culture avec des LB normaux n'entraîne pas cette différenciation.

Il existe divers types d'interaction entre les NLC et les LB-LLC (**Fig. 39**).

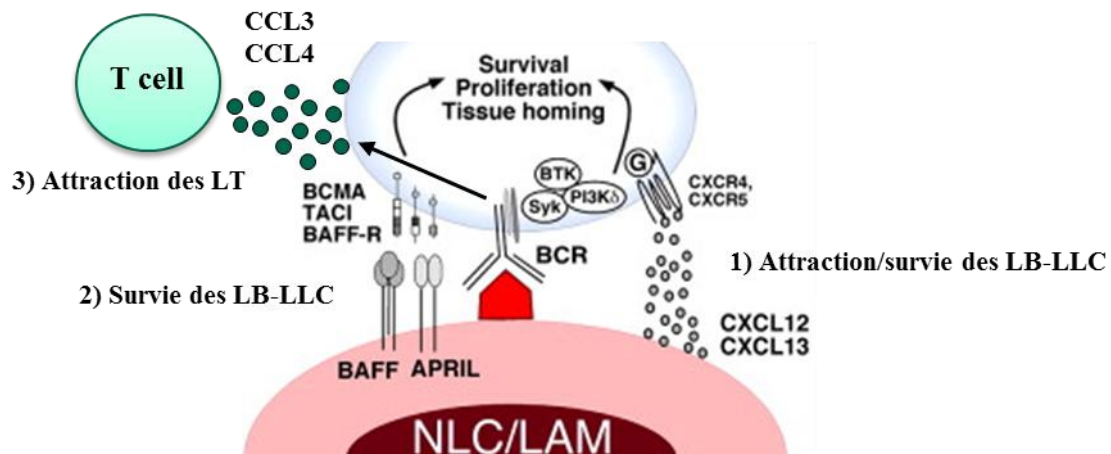


Figure 39 : Interaction des LB-LLC avec les NLC/Macrophages. Modifié d'après Burger JA, and Gribben JG. Semin Cancer Biol. 2013 [140].

D'abord, les NLC sécrètent les chimiokines CXCL12 et CXCL13 qui attirent les LB-LLC qui expriment leur récepteur respectif le CXCR4 et le CXCR5. L'interaction entre ces chimiokines et leurs récepteurs induit des signaux de survie dans les LB-LLC.

Ensuite, les NLC expriment les ligands BAFF et APRIL qui se lient à BMCA et TACI. BAFF se lie également à BAFF-R. En se liant à BMCA, TACI et BAFF-R exprimés à la surface des LB-LLC, BAFF et APRIL induisent l'activation de la voie NF- κ B, protégeant ainsi les cellules de l'apoptose [145, 146].

De plus, les NLC expriment CD31 (non indiqué sur le schéma) qui se lie à son ligand le CD38, fortement exprimé dans les LB-LLC dans les centres prolifératifs [147] et induit la prolifération et la survie prolongée des LB-LLC [148].

Enfin, les NLC peuvent présenter un antigène et activer les LB-LLC via le BCR et la co-culture des LB-LLC avec les NLC provoque une forte expression des chimiokines CCL3 et CCL4 de manière SYK, BTK et PI3K dépendante [149-151], suggérant que cette sécrétion de CCL3 et CCL4 induite par les NLC est bien BCR dépendante. Les chimiokines CCL3 et CCL4 attirent les LT qui expriment leurs récepteurs respectifs CCR1 et CCR5 et qui fournissent des signaux de survie supplémentaires aux LB-LLC.

IV.2.3. Interaction avec les LT

Il a été montré dans une étude *in vivo* de xéno greffe de CSH-LLC humaines dans un modèle de souris déficiente en lymphocytes et en NK, que l'activation des LT CD4⁺ est nécessaire pour la prolifération *in vivo* des LB-LLC [152].

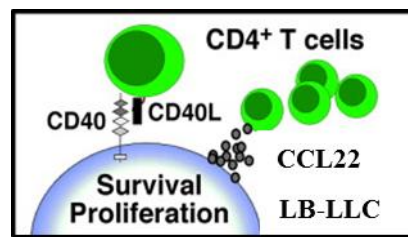


Figure 40 : Interaction des LB-LLC avec les LT helpers CD4⁺ CD40L⁺. Burger JA, and Gribben JG. *Semin Cancer Biol.* 2013 [140].

In vitro, une stimulation par le CD40L induit l'inhibition de l'apoptose spontanée et la prolifération des LB-LLC [153], notamment via l'induction de l'expression de molécules anti-apoptotiques [137] et via l'induction de la voie de signalisation NF- κ B [154]. Par ailleurs, la stimulation des LB-LLC par le CD40L permet également l'augmentation de la sécrétion de la chimiokine CCL22 [155] qui attire les LT via leur récepteur CCR4.

IV.2.4. Les centres prolifératifs

Une des principales caractéristiques de la LLC est la présence de sites particuliers appelées **centres prolifératifs** ou **pseudo-follicules** qui favorisent la prolifération et la survie des LB-LLC [137]. Ces centres prolifératifs correspondent à des agrégats de lymphocytes de tailles variables dans les ganglions et dans une moindre mesure dans la moelle. Dans les centres prolifératifs, les LT CD4+ CD40L+ sont en contact étroit avec des LB-LLC prolifératifs [155, 156], tandis que les cellules stromales se retrouvent à proximité de LB-LLC non proliférants. Ces données suggèrent la possibilité que des LT fournissent un support à court terme permettant d'activer la prolifération des LB-LLC, alors que les cellules stromales fourniraient un support à long terme favorisant la survie et l'accumulation des cellules [142, 145, 157]. La LLC pourrait ainsi être vue comme une pathologie due à l'accumulation de LB-LLC qui prolifèrent dans les centres prolifératifs et dont le contact avec les cellules stromales au sein du microenvironnement médullaire et ganglionnaire maintient leur survie.

IV.3. Attraction et rétention des LB-LLC au sein du microenvironnement : rôle du CXCR4, du CXCR5 et du CCR7

Du fait que les LB-LLC soient dépendants pour leur survie et leur expansion d'une variété de signaux issus du microenvironnement, leur passage dans la moelle ou le ganglion constitue une étape clé. Dans ce contexte, les récepteurs de chimiokines exprimés par les LB-LLC jouent un rôle majeur dans l'**attraction** et la **rétention** des LB-LLC au sein de ces microenvironnements.

IV.3.1. Expression de CXCR4, CXCR5 et CCR7 dans les LB-LLC

Les récepteurs **CXCR4**, **CXCR5** et **CCR7** jouent un rôle important dans le trafic des LB-LLC dans le microenvironnement médullaire ou ganglionnaire. Leur expression est uprégulée dans la LLC.

Des études *in vitro* ont montré que les LB-LLC issus du sang expriment un niveau élevé d'ARNm et de protéine CXCR4 [158, 159] et que ce récepteur est fonctionnel car son activation par du CXCL12 entraîne son endocytose, une mobilisation du calcium et la polymérisation de l'actine [159]. La forte expression du CXCR4 dans les LB-LLC du sang est certainement liée au fait que les niveaux plasmatiques de CXCL12 mesurés chez les patients LLC sont inférieurs à ceux observés chez les personnes saines [160].

Par ailleurs, CXCR5 et son ligand CXCL13, la chimiokine qui régule le homing et le recrutement des LB dans les follicules sont fortement exprimés dans la LLC [144, 161]. Dans les LB-LLC, CXCR5 est fonctionnel, puisque la liaison du CXCL13 conduit à l'internalisation du CXCR5, à l'augmentation de la migration cellulaire [162]. De plus, CXCL13 induit l'inhibition de l'apoptose des LB-LLC en induisant les voies Erk1/2 et AKT/GSK3 [163]. CXCR5 pourrait ainsi jouer un rôle dans le recrutement et la survie des LB-LLC dans le microenvironnement.

Les LB-LLC expriment un niveau élevé de CCR7 en comparaison à des LB normaux [161]. Une étude a rapporté que les LB-LLC circulants expriment significativement plus de CCR7 que les LB-LLC issus du ganglion [164]. Dans les LB-LLC, le CCR7 est fonctionnel puis qu'ils sont capables de migrer *in vitro* en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 et cette capacité de réponse est corrélée à la présence d'adénopathies chez les patients [165].

Ainsi il y a une surexpression des récepteurs CXCR4, CXCR5 et CCR7 dans les LB-LLC, mais très peu de modèles *in vitro* et *in vivo* permettent d'étudier la conséquence fonctionnelle d'une telle dérégulation sur le trafic des LB-LLC dans le microenvironnement.

IV.3.2. Modèle *in vitro* d'étude du rôle du CXCR4 dans l'attraction/rétention médullaire des LB-LLC

Les LB-LLC co-cultivés pendant environ 2h avec des MeSC issus de la moelle qui sécrètent CXCL12, migrent spontanément au-dessus et à travers la sous-couche de cellules stromales, selon un processus appelé pseudoempéripolèse, dépendant notamment du couple CXCR4/CXCL12 (Fig. 41). En effet ce processus peut être inhibé par un prétraitement des LB-LLC avec un anticorps anti-CXCR4, un anticorps anti-CXCL12 ou la toxine Bordetella Pertussis [159]. La stimulation des LB-LLC par le CXCL12 entraîne également une sur-expression de la MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9), ce qui permettrait aux LB-LLC de transmigrer plus facilement à travers la sous-couche de cellules stromales [166].

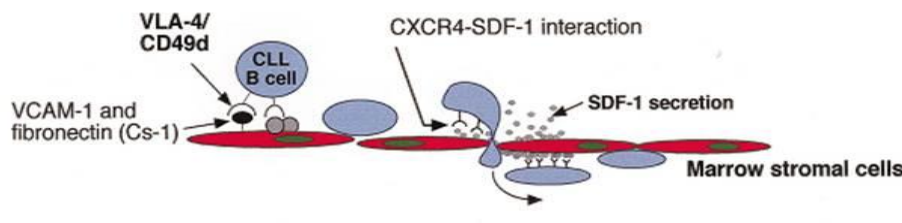


Figure 41 : La pseudoempéripolèse, modèle d'adhésion et de migration des LB-LLC sur les cellules stromales issues de la moelle. Burger JA and Kipps TJ. Leuk Lymphoma. 2002 [167].

Dans ce même modèle *in vitro* et en parallèle du couple CXCR4/CXCL12, il a été montré que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4 (CD49d) joue un rôle important dans l'interaction des LB-LLC avec les cellules stromales et la matrice extracellulaire *via* sa liaison avec VCAM-1 et la fibronectine. Cette interaction conduit à l'adhésion des LB-LLC aux cellules stromales mais permet également la transduction de signaux qui régulent l'organisation du cytosquelette, la prolifération et la survie des LB-LLC [168, 169].

IV.3.3. Hypothèses formulées sur le rôle *in vivo* du CXCR4 dans l'attraction/rétention médullaire des LB-LLC

In vivo, au sein de la moelle, les MeSC sont localisées à proximité des réseaux vasculaires qui forment la niche vasculaire (**Fig. 41**). Ces cellules sécrètent constitutivement et abondamment du CXCL12 et induisent un gradient qui attire les LB-LLC circulants via des interactions avec le CXCR4. Les LB-LLC ayant migré dans la moelle, se localisent à proximité des MSC mais peuvent également migrer vers les ostéoblastes qui sécrètent du CXCL12 au sein de la niche ostéoblastique.

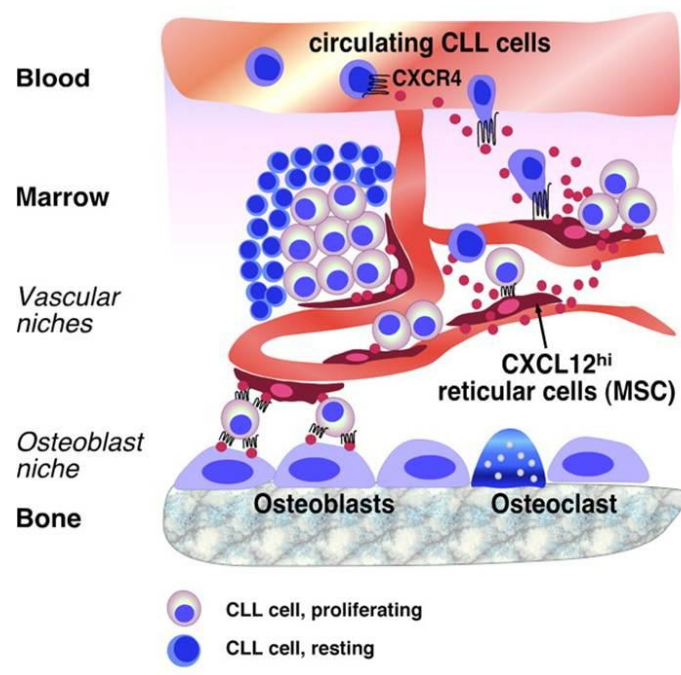


Figure 41 : Homing médullaire des LB-LLC au sein des niches hématopoïétiques. Burger JA et al. Blood. 2009 [170].

Ainsi et sur la base des informations issues des modèles d'études *in vitro*, il est proposé que le trafic des LB-LLC dans la moelle mette en jeu des processus de chimiotactisme impliquant notamment le couple CXCL12/CXCR4 [159] mais également des processus d'adhésion via notamment VLA-4. L'ensemble de ces mécanismes permettrait au final le recrutement, la rétention et la survie des LB-LLC dans des centres de prolifération au sein du microenvironnement médullaire.

IV.4. Rôle du BCR dans la physiopathologie de la LLC

Des analyses d'expression de gènes montrent que comparés à des LB-LLC issus du sang périphérique ou de la moelle, les cellules de LLC issues du ganglion présentent un profil d'activation de gènes impliqués dans les voies de signalisation du BCR [171], indiquant que la stimulation du BCR jouerait un rôle important dans l'établissement des niches de prolifération au sein du ganglion.

IV.4.1. Expression du BCR dans les LB-LLC

Les LB-LLC expriment la plupart des antigènes de surface présents à la membrane des LB normaux, y compris le CD19. Leur principale caractéristique est la co-expression du marqueur CD5 avec un faible taux d'Ig de surface (sIg). Ces sIg qui composent le BCR sont le plus souvent IgM ± IgD et rarement IgG ou IgA [172]. Les mécanismes expliquant la faible expression du BCR restent encore mal connus. L'expression membranaire des Ig qui composent le BCR dépend de leur association avec les molécules CD79a et CD79b. Il existe des variants d'ARNm de CD79a et b, issus d'épissage alternatif qui codent pour des molécules de CD79a et b ayant perdu tout ou partie de son domaine extracellulaire. Ces variants conduisent ainsi à l'expression d'une forme tronquée du CD79 (Δ CD79) [173]. Ces variants d'ARNm codant pour Δ CD79 ont été mis en évidence dans les LB-LLC, ce qui pourrait expliquer la faible expression des Ig à la surface des LB-LLC [174].

En dehors de la description d'une mutation du CD79 [175], aucune autre modification génique des composants du BCR n'a été décrite dans les LB-LLC [176]. Le taux de synthèse (ARNm, protéine) de ces composants du BCR apparaît normal, mais il semble qu'ils ne puissent être transportés et assemblés correctement à la membrane à cause d'un défaut de repliement et de glycosylation de la chaîne μ de l'IgM et du CD79a. Ce phénomène pourrait également expliquer le faible niveau d'expression du BCR à la surface des LB-LLC [177].

IV.4.2. Statut mutationnel du BCR des LB-LLC

Certains patients développent une forme agressive de LLC et doivent être traités très rapidement alors que d'autres présentent une maladie plus indolente qui ne nécessite pas de traitement. Cette variabilité est associée à une hétérogénéité des cellules de LLC basée notamment sur la présence ou l'absence de mutations somatiques des gènes codant pour la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGVH). Dans environ 50% des cas de LLC, les LB expriment des IGVH non

mutés et cette expression est associée à une LLC évolutive et à un faible taux survie du patient. En revanche les patients dont les LB expriment des IGVH mutés ont généralement une LLC stable ou qui évolue lentement [178]. La mutation des gènes des IGVH est définie par comparaison avec la séquence germinale. Une séquence qui montre une différence de plus de 2% avec la séquence germinale est considérée comme étant mutée. Ainsi, la valeur pronostic du statut mutationnel du BCR renforce l'idée selon laquelle la capacité de signalisation du BCR est impliqué dans l'évolutivité de la LLC [179, 180].

IV.4.3. Auto-réactivité, poly-réactivité et stéréotypie du BCR dans la LLC

La polyréactivité et l'autoréactivité du BCR sont des caractéristiques de LB immatures [181]. Il a été cependant montré que les Igs de surface des LB-LLC (qui ont pourtant un caractère mature) présentent le plus souvent une polyréactivité et une autoréactivité aux antigènes [182, 183] et ce caractère est majoritairement retrouvé dans les LB-LLC IGVH non mutés [184].

Par ailleurs, durant les années 90, plusieurs études ont décrit un répertoire restreint, non aléatoire, des IGVH dans la LLC qui semble être différent de celui des LB normaux [185]. Plusieurs autres publications ont depuis montré que de nombreux patients LLC présentaient les mêmes réarrangements des gènes des régions hypervariables (CDR) des Ig (BCR stéréotypés) [186, 187].

Ainsi, l'expression par les LB-LLC de BCR stéréotypés renforce l'idée selon laquelle un nombre restreint d'antigènes joueraient un rôle dans l'émergence du clone malin et/ou le développement de la maladie [188, 189].

IV.4.4. Nature des antigènes reconnus par le BCR des LB-LLC

Les LB-LLC ont des caractéristiques immunophénotypiques se rapprochant de celles des LB ayant eu une expérience antigénique [190]. Les LB-LLC peuvent reconnaître des antigènes bactériens ou des auto-antigènes tels que des protéines du cytosquelette (myosine non musculaire, vimentine, filamine B, cofiline) présentées à la surface des cellules apoptotiques [191-193] et ceci de manière dépendante du statut mutationnel des IGVH [184].

De plus, et de manière intéressante, il a été montré récemment que le domaine CDR3 du BCR des LB-LLC est capable d'interagir avec la région FR2 du domaine variable de la chaîne lourde du même ou d'un autre BCR [194]. Ce résultat suggère donc que l'interaction FR2-CDR3 permettrait une auto ou trans-stimulation des LB-LLC via leur BCR.

IV.4.5. Capacité hétérogène de signalisation du BCR des LB-LLC et relation avec l'évolutivité de la LLC

Comparés à des LB normaux, les LB-LLC stimulés *in vitro* présentent une faible signalisation du BCR caractérisée par une faible activation des protéines kinases en aval du BCR et une faible réponse calcique, comme cela est observé pour les cellules anergiques [195, 196]. La réponse des LB-LLC à l'activation du BCR *in vitro* est hétérogène [196, 197]. Les LB-LLC à IGVH non muté montrent une meilleure activation du BCR que les cas mutés qui semblent ne pas répondre au BCR [198]. Ainsi, les LB-LLC montrent des capacités de signalisation différentielles du BCR en fonction de leur statut mutationnel.

Dans ce sens, les précédents travaux de notre laboratoire ont montré que la stimulation antigénique permet de mettre en évidence une hétérogénéité caractérisée par la présence ou l'absence de réponse en termes de survie des LB-LLC *in vitro*. De plus nous avons montré que contrairement aux LB-LLC dit « non répondeurs », les LB-LLC « répondeurs » sont associés à des marqueurs pronostiques défavorables, suggérant que le caractère « répondeur » est associé à l'évolutivité de la LLC [199]. Enfin, nous avons également montré que la survie *in vitro* des LB-LLC suite à une stimulation antigénique est corrélée à la survie globale des patients [200]. Ces résultats suggèrent que les caractères « non-répondeurs et répondeurs » ont une valeur prédictive dans l'étude du devenir des patients.

IV.4.6. Dérégulation des protéines des voies de signalisation du BCR dans la LLC

Comme présenté dans la figure 34 (Chap. III.3.2.2.3), La signalisation du BCR des LB-LLC est initiée par les protéines Lyn et Syk qui conduisent à l'activation des voies PKC, PI3K et NF- κ B. Nous avons vu précédemment que certains LB-LLC répondent peu ou pas à la stimulation *in vitro* du BCR par un anti-IgM. Les LB-LLC qui ne répondent pas à la liaison de l'IgM peuvent répondre à l'engagement de l'IgD ou du CD79a [198], indiquant que les voies de signalisation en aval du BCR sont fonctionnelles et qu'il y aurait donc une dérégulation des voies de signalisation précoce du BCR dans les LB-LLC.

IV.4.6.1. Dérégulation des protéines de la signalisation précoce du BCR

Parmi les protéines kinases de la famille Src qui sont essentielles pour la signalisation précoce du BCR, seule la protéine Lyn est de 2,5 à 5 fois plus exprimée dans les cellules de LLC par rapport à des LB normaux. Alors qu'il n'a pas été trouvé de mutations responsables, cette sur-expression est probablement due à un défaut de dégradation et de localisation membranaire de la protéine qui n'est pas restreinte aux radeaux lipidiques mais diffuse dans la membrane. Elle est constitutivement activée, ce qui conduit à une résistance des cellules à l'apoptose, mais son activité augmente peu après la liaison du BCR.

La protéine kinase Syk, impliquée dans la signalisation précoce du BCR est également constitutivement phosphorylée dans les cellules de LLC [201] et son inhibition spécifique induit l'apoptose des cellules. Les activités de Syk et de PLC γ 2 mais non celle de Src sont corrélées à la réponse apoptotique des cellules CLL induite par le Dasatinib, ce qui suggère l'existence dans la LLC de mécanismes alternatifs, indépendant des kinases Src et capables d'activer Syk [202].

IV.4.6.2. Dérégulation des protéines de la signalisation plus en aval du BCR

Plusieurs études dont celle réalisée au laboratoire, ont montré une surexpression de la protéine NFAT et son activation constitutive dans la majorité des cellules de LLC [200]. Certains gènes impliqués dans la signalisation calcineurine-NFAT sont up-régulés dans les cellules ganglionnaires de LLC en comparaison avec les cellules sanguines [171].

D'autres études ont mis en évidence une phosphorylation et une activation constitutive de la p38MAPK qui n'est pas retrouvée dans les lymphocytes normaux [203]. Cependant, cette dérégulation de l'activité de la p38 ne semble pas être impliquée dans la survie cellulaire car son inhibition n'entraîne pas l'apoptose des cellules de LLC [204].

L'ensemble de ces données suggèrent une activation constitutive des protéines de la voie du BCR dans la LLC.

IV.4.6.3. Dérégulation de la voie de signalisation des PKC

L'étude du profil d'expression des isoformes de PKC montre que les LB-LLC expriment les isoformes α , β I et β II, δ , ϵ , ζ , ι ainsi que la PKD1/2 [205]. En revanche, les isoformes θ et ν n'ont pas été

décelées [206]. Ces résultats basés sur la spécificité des anticorps nécessiteraient cependant d'être confirmés à l'échelle transcriptionnelle.

Il a été mis en évidence dans les LB-LLC, une activation constitutive de plusieurs isoformes de PKC et ces dernières sont impliquées dans la survie des cellules tumorales [206]. De plus, l'activation des PKC par la Bryostatine-1 protège les cellules LLC de l'apoptose spontanée et induit une différenciation cellulaire [207].

Parmi les différentes isoformes de PKC, la PKC β II qui est un médiateur important de la signalisation BCR est surexprimée dans la LLC et son activité a été corrélée à la capacité de réponse au BCR.

Enfin, bien que les niveaux d'expression de la PKC δ soient similaires entre les LB-LLC et les LB normaux, elle est constitutivement activée dans les LB-LLC. Cette activation constitutive est dépendante de la PI3K et contrairement aux LB normaux, l'inhibition de la PKC δ par la rottlerine induit l'apoptose des LB-LLC [208]. Ces données indiquent que d'une manière générale, l'activation constitutive des voies de signalisation des PKC est importante pour la survie des LB-LLC.

IV.4.6.4. Dérégulation des voies PI3K et NF-kB

La voie PI3K est constitutivement activée dans les LB-LLC et son inhibition par le LY294002 entraîne une augmentation de l'apoptose cellulaire [204]. La stimulation du BCR entraîne une activation de la voie PI3K/Akt associée à une inhibition de l'apoptose spontanée [203]. Enfin, il existe une interconnexion entre les voies PI3K et PKC car l'inhibition de la PI3K diminue la phosphorylation des PKC dans les LB-LLC [209].

Comme dans les LB normaux périphériques, la voie NF-kB est constitutivement activée dans les LB-LLC. Cette activation de la voie NF-kB est plus élevée dans les cellules de patients présentant une LLC agressive comparées à ceux qui présentent une LLC stable [210]. La voie NF-kB peut être stimulée par de nombreux stimuli incluant la stimulation du BCR [154] et cette stimulation confère aux cellules une résistance à l'apoptose spontanée [203]. Dans ce sens, des données récentes indiquent qu'une activation de la voie canonique de NF-kB est observée à la suite d'interactions spécifiques des LB-LLC avec le microenvironnement ganglionnaire [171]. En effet, un grand nombre de gènes cibles de NF-kB sont fortement up-régulés dans les cellules ganglionnaires en comparaison avec les cellules périphériques, tandis qu'une légère augmentation est constatée dans les cellules de la moelle.

IV.4.6.5. Particularité dans la signalisation du BCR des LB-LLC : expression de ZAP-70 par les LB-LLC

ZAP-70 est une protéine kinase appartenant à la famille Syk qui n'est normalement exprimée que dans les LT et les NK. De manière surprenante, ZAP-70 est exprimée dans la plupart des LB-LLC. Son niveau d'expression est plus élevé dans les cellules à IGHV non-mutés est corrélé à l'évolutivité de la maladie [211-213]. L'expression de ZAP-70 est associée à une meilleure signalisation du BCR in vitro [214] et les raisons évoquées sont diverses. Après la stimulation du BCR, ZAP-70 est phosphorylé sur tyrosine, s'associe au CD79b [214] et augmente la phosphorylation des protéines BLNK, PLC γ 2 [215]. De manière intéressante, il a été montré dans les LB-LLC que la protéine HSP90 s'associe à ZAP-70 et que l'inhibition de HSP90 conduit à la dégradation spécifique de ZAP-70 et à l'inhibition de signalisation du BCR [216], suggérant ainsi que la stabilisation de ZAP-70 par HSP90 potentialise la signalisation du BCR dans les LB-LLC ZAP-70+.

Cependant, la présence de ZAP-70 ne semble pas obligatoirement requise pour cette signalisation dans les LB-LLC. En effet, nous avons montré que des LB-LLC ZAP-70- sont tout autant capables de répondre au BCR en terme de signal de survie que les cellules ZAP-70+ [199]. De plus, il semble que ZAP-70 facilite la transduction du signal en aval du BCR indépendamment de son activité tyrosine-kinase [217].

IV.4.6.6. Autres particularités : expression du CD5 et du CD38 par les LB-LLC

Contrairement aux LB normaux matures, les LB-LLC expriment le marqueur CD5. Dans un contexte physiologique, le CD5 joue un rôle de « gardien » contre l'auto-immunité [218] en participant au maintien de la tolérance dans les LB anergiques [219]. D'un point de vue fonctionnel, le CD5 inhibe la signalisation du BCR [220] et est associé à la réédition et la révision du BCR en dehors du centre germinatif [221]. Cependant son rôle fonctionnel vis-à-vis de la signalisation du BCR des LB-LLC n'est pas clair.

Le CD38 n'est pas un marqueur de la lignée B mais participe aux interactions cellule-cellule lors de l'hématopoïèse et la différenciation B. [222, 223]. Dans la LLC, le CD38 est majoritairement exprimé dans les cas non-muté. Son expression est associée à une meilleure capacité de réponse du BCR [197] et son interaction avec ZAP-70 potentialise la signalisation du BCR [224]. Le CD38 constitue également un indicateur d'activation et de prolifération cellulaire [225]. En effet, le CD38 favorise au sein du microenvironnement tumoral la prolifération et la survie des LB-LLC via son interaction avec

le CD31 exprimé par les NLC et d'autres cellules stromales du microenvironnement [148]. Ces mécanismes pourraient ainsi expliquer pourquoi l'expression de ZAP-70 et/ou CD38 est associée à une LLC agressive.

IV.5. Les approches thérapeutiques ciblant le microenvironnement dans la LLC

La LLC demeure une maladie incurable malgré la bonne efficacité des chimio-immunothérapies conventionnelles (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab, FCR) qui prolongent la survie de certains patients [226]. Cependant, ces traitements semblent peu efficaces pour éradiquer le clone tumoral dans la moelle ou les ganglions. De nombreuses études in vivo ont montré le rôle délétère des cellules stromales qui protège les LB-LLC contre l'apoptose induite par les chimiothérapies conventionnelles. Ceci indique qu'en plus de fournir un support pour leur survie, les microenvironnements médullaire et ganglionnaire permettent au clone tumoral d'échapper aux effets toxiques de la chimiothérapie. Ainsi, le développement de nouveaux agents thérapeutiques qui ciblent les effecteurs du micro-environnement et plus particulièrement les voies de signalisation du BCR (fig. 58) présente un intérêt thérapeutique majeur.

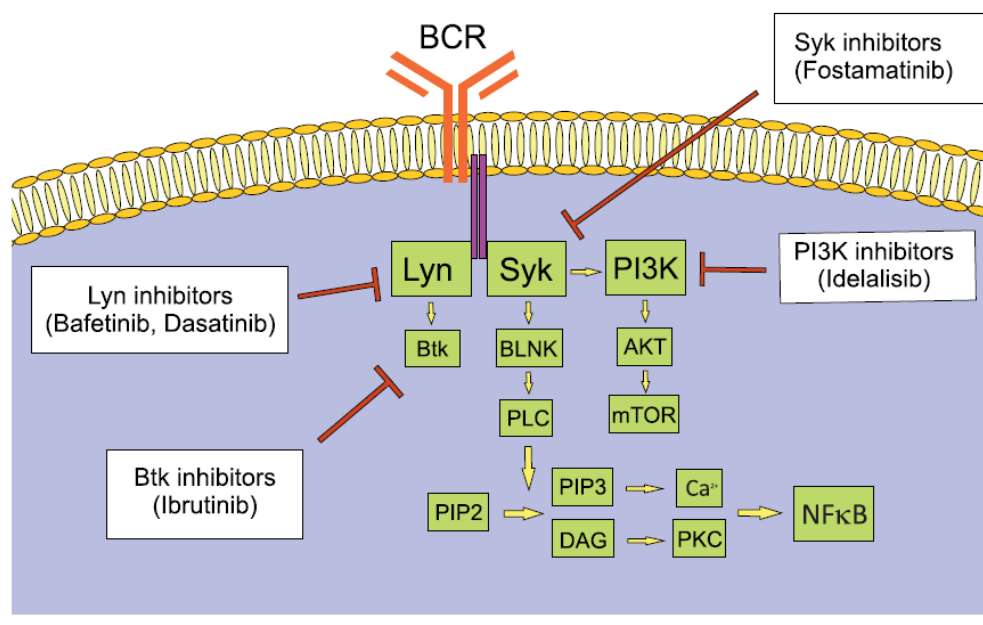


Figure 42 : Stratégies d'inhibition des principales voies de signalisation du BCR dans les LB-LLC. Robak T, Robak P. Int Rev Immunol. 2013

IV.5.1. Stratégie ciblant les voies de signalisation du BCR

IV.5.1.1. Inhibition des protéines proximales du BCR : les kinases Lyn et Syk

Lyn est une protéine kinase impliquée dans l'initiation de la signalisation du BCR. Lyn est surexprimée dans les LB-LLC et joue un rôle important dans la survie *in vitro* des cellules [227]. De ce fait, l'inhibition de Lyn constitue une voie thérapeutique intéressante.

Le dasatinib est un inhibiteur de la kinase BCR/ABL qui est utilisé dans le traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC). Le **dasatinib** inhibe également Lyn et Btk [228, 229] et induit *in vitro* l'apoptose des LB-LLC via une diminution de Mcl-1 et Bcl-XL [230]. Cet effet est corrélé à l'intensité de phosphorylation basale de Lyn [229], indiquant que le dasatinib induit son effet pro-apoptotique principalement via l'inhibition de Lyn. Deux inhibiteurs plus spécifiques de Lyn (PP2 et SU6656) ont démontré leur efficacité *in vitro* en induisant l'apoptose des LB-LLC [227].

Dans les essais cliniques de phase II, le dasatinib entraîne chez des patients réfractaires une réponse de 20%, associée à une augmentation de la survie sans progression [231].

Comme décrit précédemment, la protéine kinase **Syk** est constitutivement phosphorylée dans les LB-LLC et impliquée dans l'augmentation du signal de survie des LB-LLC induit par l'activation du BCR, par les chimiokines et par les intégrines [232], indiquant que Syk est une molécule clé dans le signal de survie induit par le microenvironnement.

Dans ce contexte, il a été montré que l'inhibition de Syk par un inhibiteur sélectif, le **R406**, induit l'apoptose des LB-LLC en bloquant les effets pro-survie du BCR et des cellules NLC [201, 233]. Le R406 bloque également la migration *in vitro* des LB-LLC induite par CXCL12 et CXCL13 [234].

Le **Fostamatinib** disodium (**R788**), qui est l'équivalent du R406, a été utilisé dans un modèle de souris LLC-like, la souris transgénique E μ -TCL1, et a montré une réduction de la survie et de la prolifération des LB tumoraux [235].

Dans les essais cliniques de phase I/II, le Fostamatinib entraîne une diminution des gènes régulés par le BCR dans les LB-LLC des patients traités [236].

IV.5.1.2. Inhibition des protéines plus en aval du BCR : les kinases Btk et PI3K

La protéine **Btk** constitue également une cible thérapeutique intéressante car cette protéine est importante pour la signalisation du BCR et son expression/activation est dérégulée dans les LB-LLC [237]. Dans cet objectif, l'**Ibrutinib (PCI-32765)** a été développé pour lier de manière covalente un résidu cystéine proche du site actif de Btk et inhiber irréversiblement l'activité kinase de Btk. *In vitro*, l'ibrutinib (i) augmente l'apoptose spontanée des LB-LLC, (ii) bloque leur survie induite par l'activation du BCR et la co-culture avec des cellules stromales, (iii) inhibe leur migration en réponse aux chimiokines CXCL12, CXCL13 et CCL19 et (iv) empêche leur adhésion à la fibronectine et à VCAM-1 [150, 237, 238].

Dans le modèle de souris pathologique TCL1 (LLC-like), l'ibrutinib entraîne une inhibition de la progression de la maladie.

Un essai clinique de phase Ib/II a montré que l'ibrutinib est bien toléré et donne un taux de réponse (complète ou partielle) élevé dans trois cohortes : 71 % chez les sujets âgés naïfs, 67 % chez les patients en rechute et 50 % chez les patients à haut risque. La rémission est durable : après vingt-deux mois de suivi, la survie sans progression est de 96 % chez les patients âgés naïfs et de 75 % chez les patients en rechute ou à haut risque [239].

Tout comme les kinases SYK et Btk, la **PI3K** est constitutivement activée dans les LB-LLC et son inhibition par le LY294002, un inhibiteur pan-PI3K, entraîne une augmentation de l'apoptose cellulaire [204].

Le **CAL-101 (GS-1101, Idelalisib)** est une molécule qui inhibe sélectivement l'isoforme δ de la PI3K, majoritairement exprimée dans les LB-LLC. *In vitro*, le CAL-101 inhibe l'activation constitutive ou induite par le BCR et les chimiokines CXCL12/CXCL13 de la PI3K δ [151] ainsi que les voies AKT/mTOR et MAPK/ERK situées en aval de la PI3K. En parallèle et comme attendu, le CAL-101 bloque les signaux de survie induits par des composants du microenvironnement tels que le CD40L, le TNF- α et la fibronectine [240].

Dans les essais cliniques de phase I, le CAL-101 entraîne une réduction de 50% des adénopathies chez 80% des patients [138]. Des essais cliniques de phase II/III sont en cours.

IV.5.2. Inhibition du récepteur CXCR4

Les cellules de LLC sur-expriment le CXCR4 et ce dernier est important pour l'attraction et le maintien des LB-LLC au sein des niches médullaires (Chap IV.3.3). *In vitro*, l'utilisation d'antagoniste du CXCR4 tels que le **Plerixafor (AMD3100)** ou le T140, supprime la migration induite par le CXCL12 ainsi que la protection contre l'apoptose induite par les drogues. Dans les essais cliniques de phase I, le Plerixafor est utilisé en combinaison avec le rituximab, un anticorps anti CD20. Les résultats préliminaires montrent une mobilisation dépendante de la concentration en AMD3100, des LB-LLC dans le sang [138].

IV.5.3. Restitution des capacités immuno-modulateurs des LT et des NK

Le lénalidomide est un agent immunomodulateur dérivé de la thalidomide qui est utilisé dans le traitement de certaines hémopathies telles que le myélome multiple ou les syndromes myélodysplasiques. Dans le cas de la LLC, le lénalidomide montre une bonne efficacité anti-tumorale chez les patients. Cependant, cet agent pharmacologique ne présente aucune activité anti-tumorale en culture *in vitro* suggérant que son effet est dépendant de facteurs liés au microenvironnement.

Dans ce contexte, une étude *in vitro* a montré qu'un traitement au lénalidomide inhibe la survie des LB-LLC induite par leur co-culture avec les NLC [241].

De plus, Ramsey AG et al. [242] ont étudié l'effet du lénalidomide sur les LB-LLC et les cellules du microenvironnement, notamment les LT et NK. (**Fig. 43**).

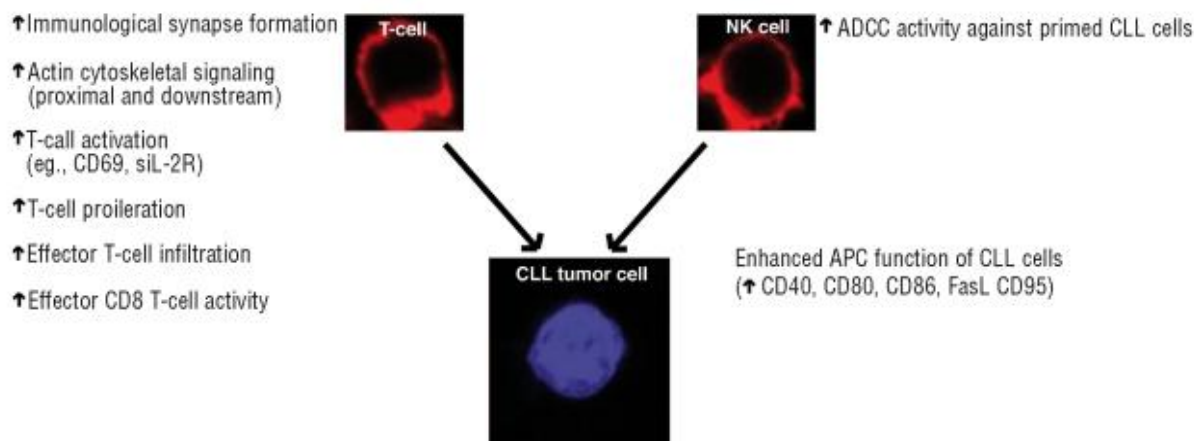


Figure 43 : Effet immunomodulateur du lénalidomide sur les LT et les NK dans le microenvironnement de la LLC. Ramsey AG et al. Haematologica. 2009[243].

Cette étude a montré :

- dans les cellules NK, une augmentation de leur activité ADCC vis-à-vis les cellules de LLC,
- dans les LT, une augmentation de l'activation et de la prolifération des LT, due certainement à une meilleure capacité à former la synapse immunologique avec les LB

Dans les LB, une augmentation PI3K dépendante de molécule de co-stimulation impliquées dans l'interaction LT-LB, telles que le CD40, le CD80 et le CD86) [244] [245].

Ces données *in vitro* suggèrent fortement que le lénalidomide a un effet sur les LB-LLC lorsqu'il se situe dans un microenvironnement cellulaire et qu'il pourrait être une bonne stratégie thérapeutique dans la LLC. Malheureusement, dans les essais cliniques, le lénalidomide montre des effets secondaires non négligeables [246].

V. Structure et régulation de la signalisation du récepteur CXCR4

Le CXCR4 est l'un des récepteurs de chimiokines les plus étudiés du fait de son rôle de co-récepteur pour l'entrée du VIH dans les cellules T et de son rôle important dans les processus de métastases dans divers cancers solides. CXCR4 est important pour le développement, l'hématopoïèse et l'organogenèse [247, 248]. Il est fortement exprimé, en condition physiologique, dans une variété de tissus et d'organes incluant la moelle osseuse, le sang et les ganglions lymphatiques. CXCR4 est surexprimé dans un certain nombre de pathologies, y compris dans la LLC [158, 159]. Le contexte de notre étude sur la régulation de l'expression du CXCR4 dans les LB-LLC en réponse à la stimulation du BCR nous a amené à nous intéresser à sa structure et à la régulation de son activation.

V.1. Structure du CXCR4

Le CXCR4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG) et qui interagit sélectivement avec la chimiokine CXCL12 (SDF-1). Chez l'homme, le CXCR4 est constitué de 352 acides aminés pour un poids moléculaire « théorique » de 39 kDa. Un certain nombre de modifications post-traductionnelles situées dans les domaines extra- et/ou intra-cellulaire du CXCR4 ont été décrites comme étant importantes pour sa fonction et notamment pour sa liaison au CXCL12.

- Dans le domaine extracellulaire du CXCR4, il existe deux sites potentiels de N-glycosylation sur les résidus asparagines Asn¹¹ et Asn¹⁷⁶ (**Fig. 44**), mais seule l'Asn¹¹ est glycosylée chez les mammifères [249]. D'un point de vue fonctionnel, une délétion de l'Asn¹¹ entraîne une augmentation de la signalisation du récepteur [250], indiquant que la glycosylation permettrait une régulation négative de la fonction du CXCR4. Il existe également trois sites de sulfatation sur les résidus tyrosines Tyr⁷, Tyr¹² et Tyr²¹ qui sont importants pour la liaison du CXCL12 [251].

- Dans le domaine intracellulaire du CXCR4, il existe de très nombreux résidus sérines (notamment les Ser^{324/325/338/339}) et thréonines susceptibles d'être phosphorylés et qui sont impliqués dans les mécanismes de régulation de la signalisation du CXCR4 (**Fig.44**).

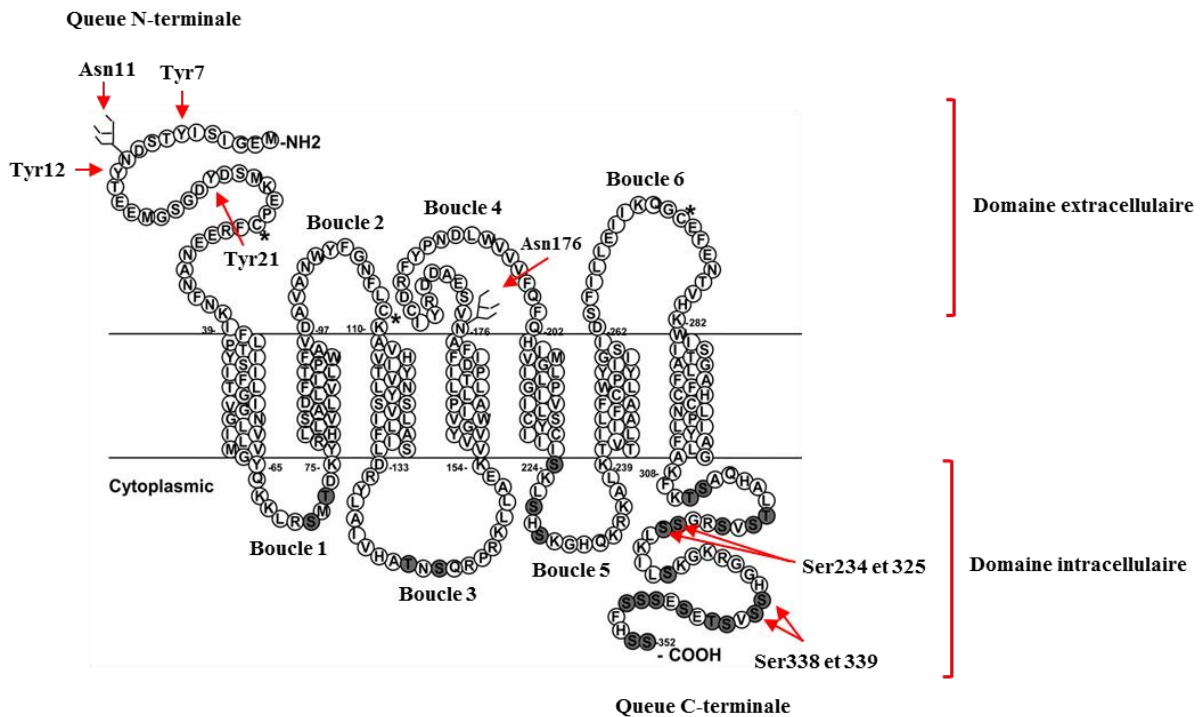


Figure 44 : Représentation de la structure en acides aminés du CXCR4. Alkhatib G. Curr Opin HIV AIDS. 2009 [252].

V.2. Régulation de la signalisation du CXCR4

En réponse à la liaison du CXCL12 sur le récepteur CXCR4, ce dernier s'homo-dimérise et induit l'activation de nombreuses voies de signalisation qui conduisent à une variété de réponses biologiques incluant la prolifération, la survie et la migration cellulaire (**Fig. 45**).

Le domaine C-terminal intracellulaire du CXCR4 est associé aux grandes protéines G hétérotrimériques. L'hétérotrimère est composé de la sous-unité $G\alpha$ attachée à la membrane par une queue lipidique, de la sous-unité $G\beta$ et de la sous-unité $G\gamma$ qui est aussi ancrée à la membrane par un groupement lipidique. L'activation du récepteur entraîne la dissociation du trimère en monomère $G\alpha$ et en dimère $G\beta/\gamma$ tous les deux capables d'initier une cascade de voies de signalisation incluant les voies MAPK, PLC, PI3K, p38, PKA et JAK/STAT (**Fig. 45**).

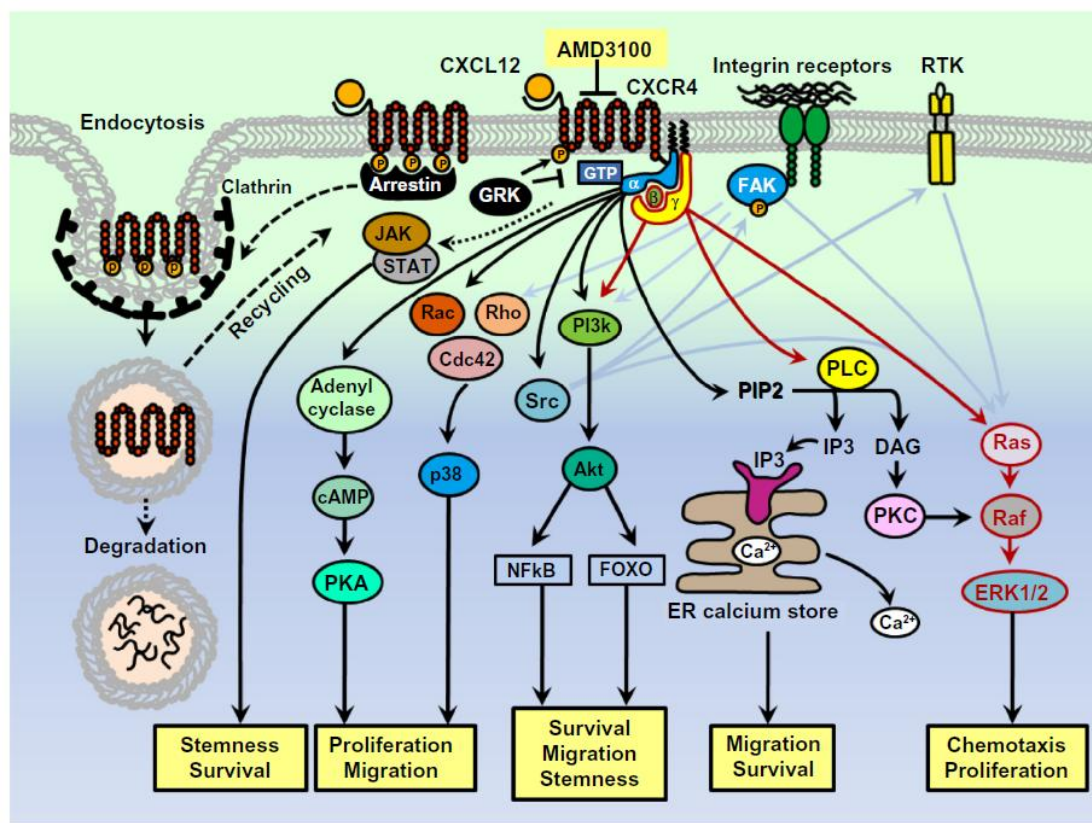


Figure 45 : Représentation schématique des voies de signalisation du récepteur CXCR4. Cojoc M et al. Onco Targets Ther. 2013 [253].

A la suite de l'interaction avec le CXCL12, trois **processus de régulation** de la signalisation du récepteur CXCR4 peuvent se mettre en place : la **désensibilisation**, l'**internalisation** et la **dégradation**.

Désensibilisation

La désensibilisation est un mécanisme de régulation négative qui aboutit à une atténuation de la signalisation du CXCR4 après son activation. Elle est initié par la phosphorylation de résidus sérine/thréonine situés dans les boucles intracellulaires 1, 3 et 5 du CXCR4 par des récepteurs kinases couplés aux protéines G (GRK) [254]. Ces phosphorylation permettent le recrutement des protéines arrestine-2 et arrestine-3 sur le CXCR4, ce qui empêche sa liaison avec d'autres protéines G et favorise son processus d'**internalisation** [255] (Fig. 45).

Internalisation

L'activation par le CXCL12 entraîne une endocytose du CXCR4 dépendante des clathrines [256, 257]. Deux études ont montré que la délétion des 42 derniers acides aminés de la région C-terminale du CXCR4 qui contient notamment 15 résidus sérine et 3 résidus thréonine entraîne une inhibition de son internalisation [256, 257]. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré qu'une activation par du PMA entraîne une augmentation de la phosphorylation des résidus Ser³²⁴, Ser³²⁵ et Ser³³⁹ associée à une internalisation du CXCR4 [257-260], suggérant ainsi un rôle des PKC dans la phosphorylation de ces sérines impliquées dans le processus d'internalisation.

D'autre part, il existe des voies d'internalisation du CXCR4 qui sont indépendantes de la liaison du CXCL12. En effet il a été montré que l'activation du TCR dans les LT (lignée Jurkat et LT murins) et du BCR dans les LB de poulet (lignée DT40) conduisaient à l'internalisation du CXCR4 [261, 262]. De plus il a été montré que le motif « S₃₂₄S₃₂₅LKIL » dans la queue C-terminale du CXCR4 (**Fig. 46**) est important pour l'internalisation du CXCR4 en réponse au PMA (lignée 293T) et à la stimulation du BCR (lignée DT40) mais pas en réponse au CXCL12 [260, 262].

Ceci indique que les résidus sérines de la partie C-terminale sont différenciellement impliqués dans l'internalisation du CXCR4 en fonction de son mécanisme d'activation [256].

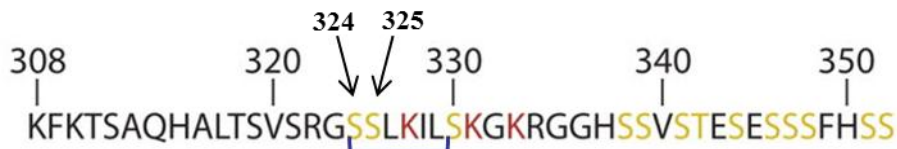


Figure 46 : Représentation des acides aminés de la queue cytoplasmique C-terminale de CXCR4. Busillo JM et al. Biochim Biophys Acta. 2007 [263].

Recyclage et Dégradation

Après son internalisation, le CXCR4 peut être recyclé et redirigé à la membrane ou être dégradé par voie lysosomiale [264, 265]. Le CXCR4 peut également être dégradé par la voie du protéasome à la suite de son ubiquitinylation et ce mécanisme implique les Lys³²⁷, Lys³³¹, et Ly³³³ ainsi que la phosphorylation des Ser³²⁴ et Ser³²⁵ [266].

VI. Structure, activation et fonction des Protéines Kinases D (PKD)

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation du BCR qui sont impliquées dans la modulation de l'expression membranaire du récepteur CXCR4 et avons identifié un rôle des protéine kinases D (PKD) dans ce processus. Ce chapitre présente donc en introduction quelques caractéristiques et propriétés des PKD.

VI.1. Les PKD appartiennent à la famille des protéines kinases calmoduline/Ca²⁺ dépendantes (CAMK)

En 1994, la PKC μ humaine a été identifiée et classée sur la base de sa structure, dans le sous-groupe des PKC nouvelles [267]. La même année, la protéine kinase D (PKD) murine, homologue de la PKC μ humaine, a été identifiée comme étant une protéine sérine/thréonine kinase capable de lier et d'être activé par les phorbols esters et le DAG [268]. Cependant, la séquence du domaine kinase de la PKC μ /PKD murine montrait peu de similitude avec les autres PKC mais présentait une homologie de structure avec celle de la famille des protéines kinase Ca²⁺/ calmoduline dépendantes (CAMK). Par ailleurs, la majorité des substrats connus pour être phosphorylés par les PKC ne l'étaient que très peu par cette PKC μ /PKD murine. Quelques années plus tard, deux autres protéines kinases ont été identifiées comme ayant une forte homologie de séquence avec la PKC μ /PKD : la PKD2 et la PKD3 anciennement identifiée comme PKC ν [269, 270]. Ainsi et sur la base de leur homologie, les PKD1/PKC μ , PKD2 et PKD3/PKC ν ont été regroupées dans la famille des PKD qui a été classée comme un sous-groupe à part entière appartenant à la famille des protéines CAMK (**Fig. 47**).

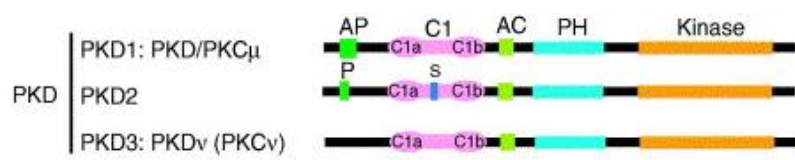


Figure 47 : Structure de la famille des Protéine Kinase D. Wang QJ. Trends Pharmacol Sci. 2006. [271].

La PKD contient notamment un domaine Ser/Thr kinase dans la partie C-terminale, un domaine cystéine-rich (CRD) composé de deux domaines C1 (a et b) qui lient le diacylglycérol (DAG) et les phorbols esters et un domaine PH qui se lie à des phospholipides membranaires. Il a été montré que les domaines CRD et PH jouent un rôle auto-régulateur de l'activité de la protéine. En effet, une délétion du domaine CRD ou du domaine PH conduit à une activation constitutive de la PKD [272, 273], indiquant un rôle de ces domaines dans le maintien de la protéine dans une conformation inactive.

VI.2. Processus d'activation des PKD par phosphorylation

Les PKD purifiées présentent *in vitro* une activité catalytique basale relativement faible qui peut être stimulée par le DAG ou les phorbols esters [274, 275].

Dans les cellules, l'activation des PKD est inhibée par un traitement avec des inhibiteurs de PKC (Bisindolylmaleimide I, Ro 31-8220) alors que ces inhibiteurs n'ont aucun effet *in vitro* sur les PKD purifiées [276]. Par ailleurs, des études ont montré que la co-transfection de PKD avec des formes constitutivement actives des nPKC (δ , ϵ , η , θ), conduisait à une activation des PKD en absence de stimulation des cellules [276, 277], suggérant ainsi un rôle des PKC dans le processus d'activation *in vivo* des PKD.

De manière intéressante, le site d'activation des PKD montre une homologie de séquence avec celui de la famille des protéines MEK. En particulier, le site d'activation des MEK comporte les Ser²¹⁸ et Ser³²² qui sont phosphorylées par Raf. L'espace entre ces deux résidus est identique à celui existant entre les résidus Ser⁷⁴⁴ et Ser⁷⁴⁸ retrouvés dans le domaine catalytique des PKD (**Fig. 48**). En accord avec cette observation, une étude a montré que la substitution de ces deux serines par des alanines inhibe l'activation des PKD induite par les phorbols esters, alors que leur remplacement par des acides glutamiques augmente l'activité basale en absence de stimulation [278]. Ces données indiquent donc que la phosphorylation des résidus Ser⁷⁴⁴ et Ser⁷⁴⁸ de la PKD est importante pour son activation.

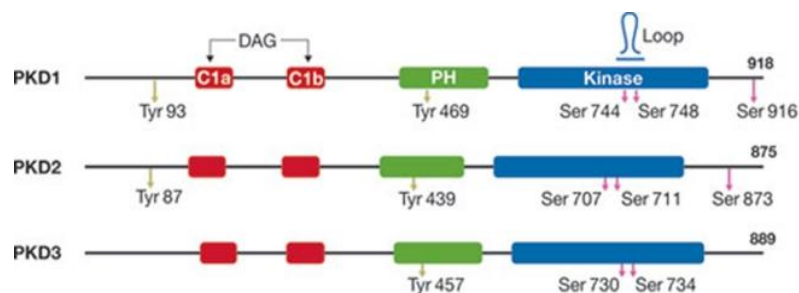


Figure 48 : Représentation des principaux sites de phosphorylation impliqués dans l'activation des PKD. Fu Y and Rubin CS. EMBO Rep. 2011 [279].

Par ailleurs, il a été montré que ces deux sites sont inclus dans un motif peptidique qui présente des homologies avec la séquence cible de la PKC η [280], suggérant que ces résidus puissent être phosphorylés par les PKC. En accord avec ces données, une étude a montré que les PKC η , ϵ , et ζ phosphorylent la PKD sur les résidus Ser⁷⁴⁴ et Ser⁷⁴⁸ et que cette activation est corrélée à l'activité de la PKD. L'ensemble de ces données suggère donc que les PKD puissent être activées directement *in vitro* par le DAG ou les phorbols esters mais que leur activation *in vivo* par phosphorylation des sérines^{744/748} serait dépendante des PKC. Ce dernier mécanisme a été observé dans différents types cellulaires y compris dans des LB en réponse à la stimulation du BCR [281].

Cependant et de manière intéressante, des activations de PKD indépendante des PKC ont également été décrites. En effet, la stimulation du récepteur de la bombésine (récepteur RCPG) entraîne une phosphorylation précoce (1-5min) des Ser^{744/748} de manière dépendante des PKC suivie d'une phosphorylation plus tardive (>45min) de ces mêmes résidus mais de manière indépendante des PKC cette fois [282, 283]. Ceci suggère qu'en réponse à une stimulation soutenue, la phosphorylation des PKD sur les Ser^{744/748} deviendrait indépendante des PKC.

Enfin, la Ser⁹¹⁶ présente dans la partie c-terminale de la PKD1 et la PKD2 mais absente dans celle de la PKD3 (**Fig. 48**), est également phosphorylée en réponse à divers stimuli tels que les esters de phorbols, la stimulation du BCR dans les LB ou celle du TCR dans les LT [284]. Cette étude a montré que la phosphorylation de la Ser⁹¹⁶ est dépendante du domaine kinase de la PKD et que le niveau de phosphorylation de cette Ser⁹¹⁶ est corrélé au niveau d'activation de la PKD. Ainsi, la Ser⁹¹⁶ est un site d'autophosphorylation des PKD qui reflète le niveau d'activation des PKD.

VI.3. Localisation sub-cellulaire des PKD

Dans les cellules au repos, la PKD est présente dans le cytosol et dans une moindre mesure dans le golgi ou la mitochondrie [285, 286]. En réponse à différents stimuli, la PKD est transloquée vers différents compartiments subcellulaires tels que la membrane plasmique ou le noyau [286-288]. Ces mouvements nécessitent des interactions réversibles entre différents domaines de la protéine et les molécules associés à la membrane plasmique ou au noyau et se font dans un ordre séquentiel (**Fig. 49**). La première étape est la liaison de la PKD via son motif C1b (ou cys2) au DAG produit par l'activation de la Phospholipase C en réponse au stimulus et cette interaction permet le démasquage des Ser^{744/748}. La seconde étape est la phosphorylation des PKD sur les résidus Ser^{744/748} qui stabilise la conformation active de la protéine et entraîne sa translocation de la membrane vers le cytosol. La PKD

activée peut ensuite être importée via son domaine C1b vers le noyau où elle s'accumule transitoirement avant d'être exportée dans le cytoplasme via l'exportine-1 (ou CRM-1) selon un mécanisme dépendant de son domaine PH [289].

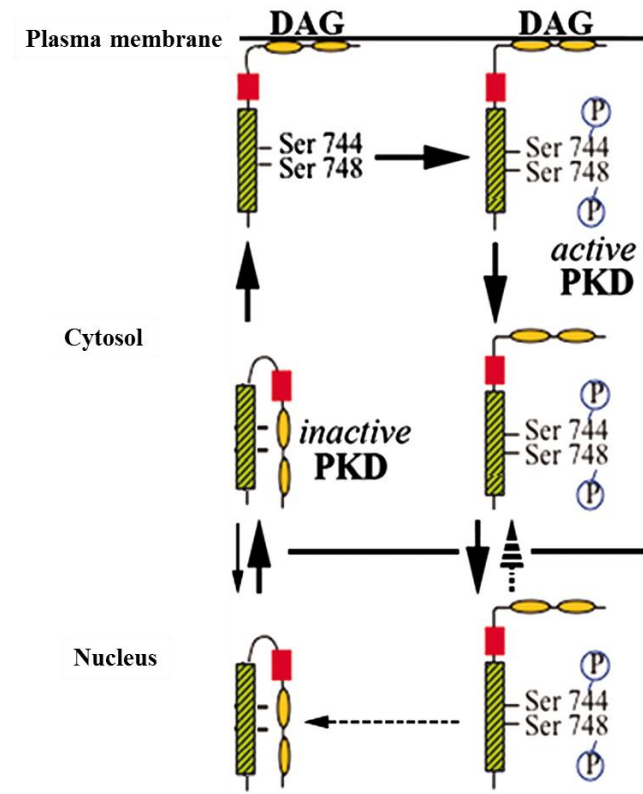


Figure 49 : Modèle de régulation de la distribution intracellulaire des PKD. Rozengurt E et al. J Biol Chem. 2005 [289].

VI.4. Fonctions diverses des PKD

Les PKD sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la migration cellulaire, l'invasion cellulaire, la prolifération cellulaire et la régulation de la signalisation du TCR dans les LT et du BCR dans les LT [271, 289].

VI.4.1. Rôle des PKD dans la migration cellulaire

La formation de lamellipodes est indispensable pour les processus de migration cellulaire. La première étape est la rupture des filaments d'actines sous l'action de la cofiline. Cette action de la cofiline active

va permettre la formation de nouveau filament d'actine à l'origine de la formation des lamellipodes et ce processus nécessite la déphosphorylation de la cofiline par la phosphatase SSH1L (**Fig. 50**).

De plus, un complexe WAVE2-cortactine-ARP2/3 orchestre un processus de polymérisation/dépolymérisation de l'actine indispensable à la formation des lamellipodes et donc au processus de migration cellulaire. Il a été montré que la PKD1 s'associe et phosphoryle d'une part SSH1L et d'autre part la cortactine, créant des sites d'interaction de ces deux protéines avec la protéine de séquestration 14-3-3 [252, 290]. La séquestration de SSH1L par 14-3-3 conduit à l'inactivation de la cofiline et celle de la cortactine entraîne la stabilisation de l'actine, l'ensemble de ces mécanismes conduisant à l'inhibition de la formation des lamellipodes. Ainsi, de par son rôle d'inhibiteur de la formation des lamellipodes, la PKD1 joue un rôle anti-migration.

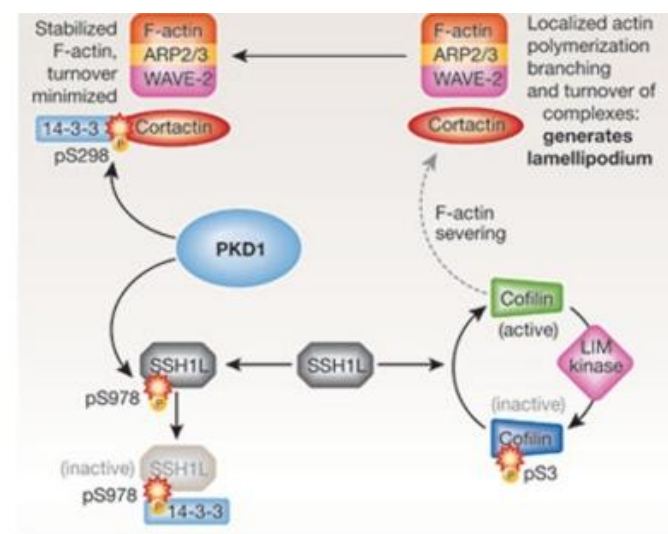


Figure 50 : Rôle inhibiteur de PKD1 dans la formation des lamellipodes. Fu Y and Rubin CS. EMBO Rep. 2011 [279].

VI.4.2. Rôle des PKD dans la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion cellulaire

Dans les processus cancéreux, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) se caractérise par un changement de morphologie cellulaire et par l'expression de gènes qui conduisent à la perturbation des contacts cellulaires, à la mobilité et à l'invasion cellulaire. Une des caractéristiques de l'EMT est la diminution de l'expression de la molécule d'adhésion cellulaire E-Cadhérine (E-Cad). Il a été montré que la PKD1 activée phosphoryle la queue cytoplasmique de l'E-Cad. Cette phosphorylation de l'E-Cad entraîne une stabilisation de son interaction avec la β -caténine et la F-actine [291] et donc une inhibition de la mobilité cellulaire en renforçant l'adhésion entre les cellules cancéreuses. De manière intéressante, il a été mis en évidence une sous-expression de la PKD1 dans les stades avancés du

cancer de la prostate et dans les cancers du sein et de l'estomac et cette sous-expression est associée à celle de l'E-cad et de la β -Cat [292, 293]. De plus, la PKD1 est essentielle pour le maintien d'un taux basal de transcription du gène de l'E-Cad [294]. Enfin, il a été montré dans un modèle de xénotransplante qu'une surexpression de la PKD1 entraîne une diminution de l'expression des protéines impliquées dans l'EMT et inhibe de 70% du développement tumoral [294]. L'ensemble de ces données suggère donc que la PKD1 joue un rôle important dans les phénomènes anti-invasifs via l'inhibition du processus d'EMT.

VI.4.3. Rôle des PKD dans la prolifération cellulaire

Une surexpression de PKD1 constitutivement activée entraîne l'activation d'Erk, ce qui suggère un rôle de la PKD1 dans l'activation de la voie Raf-MEK-ERK [295].

Rab interactor 1 (RIN1) est une protéine qui sous sa forme non phosphorylée inhibe l'interaction Ras/Raf et donc l'activation de la voie MEK/ERK [296]. Dans ce contexte, la phosphorylation de RIN1 par la PKD1 entraîne la liaison de RIN1 à la protéine 14-3-3 qui séquestre RIN1 dans le cytosol et l'empêche d'inhiber l'interaction entre Ras et Raf. Ainsi, l'activation de la PKD1 facilite l'activation de la voie MEK/ERK qui conduit à la prolifération cellulaire. Ce rôle de PKD1 a été retrouvé dans plusieurs modèles y compris dans le cancer du pancréas où la surexpression de PKD1 favorise la prolifération cellulaire [297].

VI.4.4. Rôle des PKD dans la signalisation du BCR

Dans la majorité des travaux sur l'expression des PKD dans différentes lignées de LB, les investigateurs ont utilisé des anticorps ne permettant pas à l'époque de distinguer les isoformes PKD1 et PKD2, alors que l'expression de la PKD3 dans les LB était établie [298]. En 2009, Matthews et al. ont démontré clairement que par l'isoforme PKD2 et très largement majoritaire dans les LB par rapport à la PKD1. Ces données suggèrent donc que les isoformes PKD2 et PKD3 sont majoritairement exprimées dans les LB [299].

Par mesure de précaution, nous parlerons dans ce chapitre du rôle de la PKD dans la signalisation du BCR sans apporter de précision sur l'isoforme concernée, sauf si l'étude le permet.

La stimulation du BCR dans les LB (lignée DT40) active la PKD [281] et régule sa localisation subcellulaire. Dans les lymphocytes au repos, la PKD se localise dans le cytosol. Après stimulation antigénique, elle est transloquée à la membrane [286] puis se relocalise dans le cytosol après 10 minutes de stimulation où elle reste active pendant plusieurs heures. La PKD peut ainsi activer séquentiellement des substrats différents en fonction de sa localisation membranaire ou cytosolique.

D'un point de vue mécanistique, il a été montré une association constitutive entre la PKD et Btk dans les LB humain (lignée SKW 6.4) [300] et que l'activation de la PKD en réponse à la stimulation du BCR (LB souris) ou *via* une co-stimulation avec le CD19 requière les protéines Vav, PI3K et PLC γ 1 et 2 [301]. Dans des splénocytes de souris, la PKC δ est associée au BCR et elle est impliquée dans la phosphorylation de la PKD en réponse à la stimulation du BCR [302]. La PKD a été également retrouvée associée au BCR dans des lignées lymphoblastoïdes et son activation par le BCR requière Syk. Cependant, cette « même » PKD peut jouer un rôle de régulateur négatif du BCR en inhibant l'activité de Syk [281].

Par ailleurs, une étude a montré de manière plus précise que la stimulation du BCR entraîne une augmentation de la phosphorylation de la PKD sur les résidus Ser^{744/748} et Ser⁹¹⁶ et que la phosphorylation des Ser^{744/748} est dépendante des PKC et nécessaire pour l'activation des PKD dans les LB [303]. Enfin, il a été montré dans les cellules DT40 de poulet et les lignées B humaines Raji et Ramos que la stimulation du BCR conduit à l'activation de la PKD3 (isoforme bien identifiée dans cette étude) de manière PLC γ et PKC dépendante [298].

En conclusion, ces données montrent que la stimulation du BCR entraîne dans différents modèles de cellules B une activation de « la PKD » via une induction/augmentation de la phosphorylation des Ser^{744/748} et Ser⁹¹⁶ et que la phosphorylation des Ser^{744/748} se ferait principalement de manière dépendante des PKC.

VII. Objectifs de la thèse

L'évolutivité de la LLC est caractérisée par la présence d'adénopathies qui reflètent l'accumulation des cellules de LLC au sein du microenvironnement ganglionnaire. Des analyses d'expression de gènes montrent que comparés à des LB-LLC issus du sang périphérique ou de la moelle, LB-LLC issus du ganglion présentent un profil d'activation de gènes impliqués dans les voies de signalisation du BCR [171]. Le ganglion étant le siège de la stimulation du BCR par l'antigène, ces données indiquent donc que la stimulation du BCR jouerait un rôle important dans l'établissement des niches de prolifération au sein du ganglion. Il a été montré que le contact des LB-LLC avec le microenvironnement peut conduire à une down-régulation du CXCR4 [304], suggérant que des effecteurs de la migration et du trafic des LB-LLC pourraient être modulés dans le microenvironnement ganglionnaire.

Dans le but d'élargir nos connaissances sur le rôle joué par la stimulation antigénique dans l'établissement du pool prolifératif des LB-LLC au sein du microenvironnement ganglionnaire, les objectifs de ce travail étaient :

1) D'analyser l'impact de la stimulation *in vitro* du BCR sur l'expression membranaire d'effecteur clés pour la migration intra-ganglionnaire des LB-LLC. Plus précisément, nous avons centré notre étude sur l'analyse de la modulation de l'expression des récepteurs CXCR4 et CD62L en réponse à la stimulation du BCR.

2) Dans le but d'approfondir ces résultats, le deuxième objectif a été de caractériser les intermédiaires de signalisation activés en aval du BCR et qui sont impliqués dans la downrégulation de ces effecteurs de la migration. Plus précisément, nous avons centré notre étude sur l'analyse des voies de signalisation du BCR et des mécanismes impliqués dans la down-régulation du CXCR4.

VIII. Résultats

VIII.1. Downrégulation du CXCR4 et du CD62L en réponse à la stimulation du BCR des LB de Leucémie Lymphoïde Chronique et relation avec l'évolutivité de la maladie

VIII.1.1. Introduction

Une des caractéristiques de la LLC est la présence d'adénopathies chez les patients évolutifs. Ces adénopathies reflètent une accumulation de LB-LLC au sein du microenvironnement ganglionnaire qui pourrait être due à une altération du trafic ganglionnaire et de la recirculation des LB-LLC.

Au sein du ganglion, la stimulation antigénique joue un rôle majeur dans l'activation, la maturation et la mobilité des LB (Chap. III.3).

Nous avons formulé l'hypothèse que la stimulation antigénique pourrait être impliquée dans les phénomènes de rétention accumulation des LB-LLC conduisant à l'apparition des adénopathies chez les patients évolutifs.

Le **CXCR4** joue un rôle dans la migration des plasmoblastes depuis le centre germinatif, vers les cordes médullaire riches en CXCL12, d'où ils peuvent **sortir du ganglion** en suivant le flux lymphatique [130], suggérant que le CXCR4 jouerait un rôle dans la sortie de ces cellules du ganglion.

Par ailleurs, le **CD62L** a été identifié comme étant important pour l'adhésion des LB aux cellules endothéliales lymphatiques [90]. Basé sur l'importance de la traversée de l'endothélium lymphatique des sinus paracorticaux pour la sortie des LB du ganglion, ces données suggèrent que le CD62L pourrait être impliqué dans la sortie des LB du ganglion.

Contenu de l'importance de ces effecteurs pour le trafic intra-ganglionnaire des LB, l'objectif de cette première étude a été d'analyser l'effet d'une stimulation *in vitro* du BCR sur l'expression du CXCR4 et du CD62L dans les LB-LLC.

VIII.1.2. Résultats

La stimulation in vitro du BCR induit l'internalisation du CXCR4

Nous avons montré une diminution de l'expression du CXCR4 à la surface des LB-LLC stimulés *in vitro* (pendant 24h) par un anti-IgM immobilisé. En 1999, Guinamard R et al. avaient montré dans les LB de poulet (lignée DT40) que la stimulation du BCR par un anti-IgM diminue l'expression membranaire du CXCR4 [262], mais jusque-là, aucun résultat similaire n'avait été observé dans les LB-LLC.

a) D'un point de vue mécanistique, nos analyses ont mis en évidence que dans les LB-LLC, la stimulation antigénique *in vitro* entraîne :

- une accumulation intracellulaire du CXCR4 suite à sa disparition à la surface cellulaire,
- une inhibition de la diminution de l'expression du CXCR4 à la surface cellulaire en présence d'un inhibiteur (le sucrose) de l'endocytose clathrines dépendante,
- une réexpression rapide du CXCR4 à la surface cellulaire suite à l'arrêt de la stimulation du BCR,
- et une diminution du taux de protéine totale (intracellulaire+extracellulaire) qui est inhibée en présence d'un inhibiteur du protéasome (MG132).

Nous avons ainsi montré pour la première fois, que dans les LB-LLC, une stimulation soutenue (24h) du BCR régule l'expression membranaire du CXCR4 par des mécanismes d'endocytoses clathrines dépendante associés à des mécanismes de recyclage/réexpression à la surface cellulaire et des mécanismes de dégradation, comme décrit dans la figure 45 (Chap. V.2) en réponse au CXCL12.

b) D'un point de vue fonctionnel, compte tenu de l'impact de la stimulation du BCR des LB-LLC sur l'expression du CXCR4, nous avons analysé leur capacités de migration *in vitro* en réponse au CXCL12 par un test de chimiotactisme « en chambre de boyden ». Nos résultats montrent que la diminution du CXCR4 après stimulation du BCR est associée à une **réduction d'environ 36% des capacités de migration des LB-LLC**.

La stimulation du BCR entraine le shedding du CD62L

Parallèlement à l'internalisation du CXCR4, nous avons également montré une diminution de l'expression du CD62L à la surface des LB-LLC stimulés *in vitro* (pendant 24h) par un anti-IgM immobilisé.

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression du CD62L à la surface cellulaire et à analyser les conséquences fonctionnelles d'une telle downrégulation sur les capacités d'adhésion des LB-LLC. **Ces deux objectifs ont fait l'objet de ma contribution à ce premier travail.**

a) Dans le cadre d'une étude mécanistique, nous avons émis l'hypothèse que la downrégulation du CD62L pourrait être due à un mécanisme de clivage « shedding » conduisant à un relargage du CD62L soluble.

Nous avons dosé à l'aide d'un test ELISA la quantité de CD62L soluble dans le surnageant des LB-LLC après la stimulation du BCR. Nos résultats montrent une augmentation rapide, dès 30 minutes du CD62L dans le surnageant des LB-LLC stimulés.

Nos données sont en accord avec celles de la littérature qui montrent que dans les LT, l'activation du TCR entraine un shedding rapide (30-60') du CD62L [305].

b) Une autre étude a par ailleurs montré que chez la souris, la downrégulation du CD62L diminue l'entrée dans le ganglion des LT activés [306]. Sachant que le CD62L interagit avec le récepteur au mannose exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques et régule ainsi l'adhésion des LB [90], nous avons analysé l'effet du shedding du CD62L sur les capacités d'adhésion *in vitro* des LB-LLC sur une monocouche de cellules endothéliales lymphatiques (lignées SVEC4-10).

Nos résultats montrent la stimulation du BCR entraine une diminution d'environ 37% des capacités d'adhésion des LB-LLC.

L'intensité de downrégulation du CXCR4 et du CD62L est variable selon les patients de LLC et corrélée à l'évolutivité de la LLC

L'analyse de la downrégulation du CXCR4 et du CD62L a été réalisée sur une série de 30 patients LLC. Pour chaque patient, nous avons quantifié la downrégulation de ces effecteurs en terme de « réponse CXCR4 ou CD62L », correspondant au pourcentage de cellules qui downrégulent ces effecteurs après stimulation du BCR (voir article 1). Nos analyses ont révélé l'existence au sein de cette série de patient d'un groupe dit « **répondeur** » qui downrégule le CXCR4 et le CD62L avec une

réponse supérieur à 5% ; et d'un groupe dit « **non répondeur** » qui montre une réponse inférieur à 5%.

Enfin, de manière intéressante, nous avons montré que contrairement aux patients « non répondeurs », les patients « répondeurs » sont associés à des marqueurs de mauvais pronostic et à une LLC évolutive.

Conclusion

Nous avons montré que la stimulation soutenue du BCR entraîne une downrégulation du CXCR4 et du CD62L associée à une diminution de la migration et d'adhésion des LB-LLC. De plus nous avons montré dans ce travail que l'intensité de downrégulation de ces effecteurs est variable, selon les patients et surtout corrélée à l'évolutivité de la maladie. Ces données suggèrent qu'à travers une perturbation du trafic ganglionnaire, la stimulation du BCR pourrait participer à l'accumulation des LB-LLC dans le ganglion des patients évolutifs.

VIII.1.3. Article 1

Down-regulation of CXCR4 and CD62L in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Triggered by B-Cell Receptor Ligation and Associated with Progressive Disease

Amalia Vlad,^{1,2} Pierre-Antoine Deglesne,¹ Rémi Letestu,^{1,2} Stéphane Saint-Georges,¹ Nathalie Chevallier,¹ Fanny Baran-Marszak,^{1,2} Nadine Varin-Blank,¹ Florence Ajchenbaum-Cymbalista,^{1,2} and Dominique Ledoux¹

¹UMR U978 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Université Paris 13, UFR SMBH and ²AP-HP, Service d'hématologie biologique, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

Abstract

Progressive cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) are frequently associated with lymphadenopathy, highlighting a critical role for signals emanating from the tumor environment in the accumulation of malignant B cells. We investigated on CLL cells from 30 untreated patients the consequence of B-cell receptor (BCR) triggering on the membrane expression of CXCR4 and CD62L, two surface molecules involved in trafficking and exit of B-lymphocytes from lymph nodes. BCR stimulation promoted a strictly simultaneous down-regulation of CXCR4 and CD62L membrane expression to a variable extent. The variable BCR-dependent decrease of the two proteins was strikingly representative of the heterogeneous capacity of the CLL cells to respond to BCR engagement in a given patient. Functionally, cells down-regulating CXCR4 and CD62L in response to BCR engagement displayed a reduction in both migration toward CXCL12 and adhesion to lymphatic endothelial cells. Remarkably, the ability of CLL cells to respond to BCR ligation was correlated with unfavorable prognostic markers and short progression-free survival. In conclusion, BCR signaling promotes decrease of CXCR4 and CD62L membrane expression in progressive cases only. These results are consistent with the hypothesis that BCR-mediated signaling pathways favor accumulation of a proliferative pool within the lymph nodes of progressive CLL cases. [Cancer Res 2009;69(16):6387–95]

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by a highly variable clinical course. Aggressive CLLs are associated with enlarged lymph nodes (LN) and splenomegaly resulting from the accumulation of malignant B lymphocytes within secondary lymphoid organs (1, 2). This indicates that the recirculation process of CLL cells from blood to lymphoid tissues might be crucial for CLL cells accumulation and survival and highlights the predominant role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of CLL (3, 4).

CLL microenvironment contains several cytokines acting through autocrine/paracrine mechanisms to affect CLL cell survival, migration, and resistance to drug-induced apoptosis (5, 6). Among them, the CXCL12 chemokine and its receptor CXCR4 seem to play an important role for homing of CLL cells into the bone marrow but also for CLL cell survival through cell-to-cell contacts with marrow stromal and/or nurse-like cells (7–9). Moreover, CXCR4-specific antagonists suppressed the protective effect of stromal cells on leukemic cell survival and drug-induced apoptosis (10, 11), thus highlighting the rationale for targeting the CXCR4/CXCL12 axis in CLL (12). Recent evidence indicates that CXCR4-CXCL12 interactions also play an important role in directing the movements of lymphoid cells within secondary lymphoid organs (13). CXCR4 expression on B-cells is essential for the organization of germinal center and for centroblast migration into the CXCL12-rich dark zone (14). On the other hand, the process of B-lymphocyte emigration from LNs and spleen is controlled in part via CXCR4-CXCL12 interactions. CXCR4 is critical for normal homing of activated B lymphocytes to the spleen red pulp and the LNs medullary cords, two CXCL12-enriched zones through which B lymphocytes egress from lymphoid organs and return to circulation (15, 16). During homing, B lymphocytes adhere then cross the sinusoidal endothelium before entering the efferent lymphatic vessel and exit from LNs. Recently, CD62L (L-selectin) was identified as crucial for B-lymphocyte binding to sinusoidal endothelial cells through interaction with mannose receptor (17). Thus, CD62L and its lymphatic receptor may participate in the mechanisms mediating lymphocytes exit from LNs.

B-cell receptor (BCR) activation is critical for B-lymphocyte development, proliferation, survival, and mobility within LNs (18). BCR activation could play a central role in CLL by participating in the selection and the expansion of the malignant clone (19, 20). Our group and others have recently reported that sustained activation of BCR with immobilized anti-IgM antibodies promoted *in vitro* CLL cell survival (21, 22) and that this survival advantage is restricted to a subset of patients with progressive disease and unfavorable prognostic factors (22). Considering the emerging role of BCR activation in CLL and the potential involvement of CXCR4 and CD62L in the physiologic B-lymphocyte recirculation process, we hypothesized that BCR stimulation may contribute to the accumulation of CLL cells in secondary lymphoid organs by regulating CXCR4 and CD62L membrane expression. We therefore explored *in vitro* the impact of BCR activation on cell surface expression of CXCR4 and CD62L. Our data show that sustained anti-IgM stimulation of CLL cells promoted a concomitant down-regulation of CXCR4 and CD62L only in a subset of patients with unfavorable prognostic markers and a risk of disease progression. Moreover, this

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Dominique Ledoux and Florence Ajchenbaum-Cymbalista, UMR U978 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Université Paris 13, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France. Phone: 33-0-1-48-95-59-28; Fax: 33-0-1-48-95-56-27; E-mail: dominique.ledoux@avc.aphp.fr and florence.cymbalista@avc.aphp.fr.

©2009 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4750

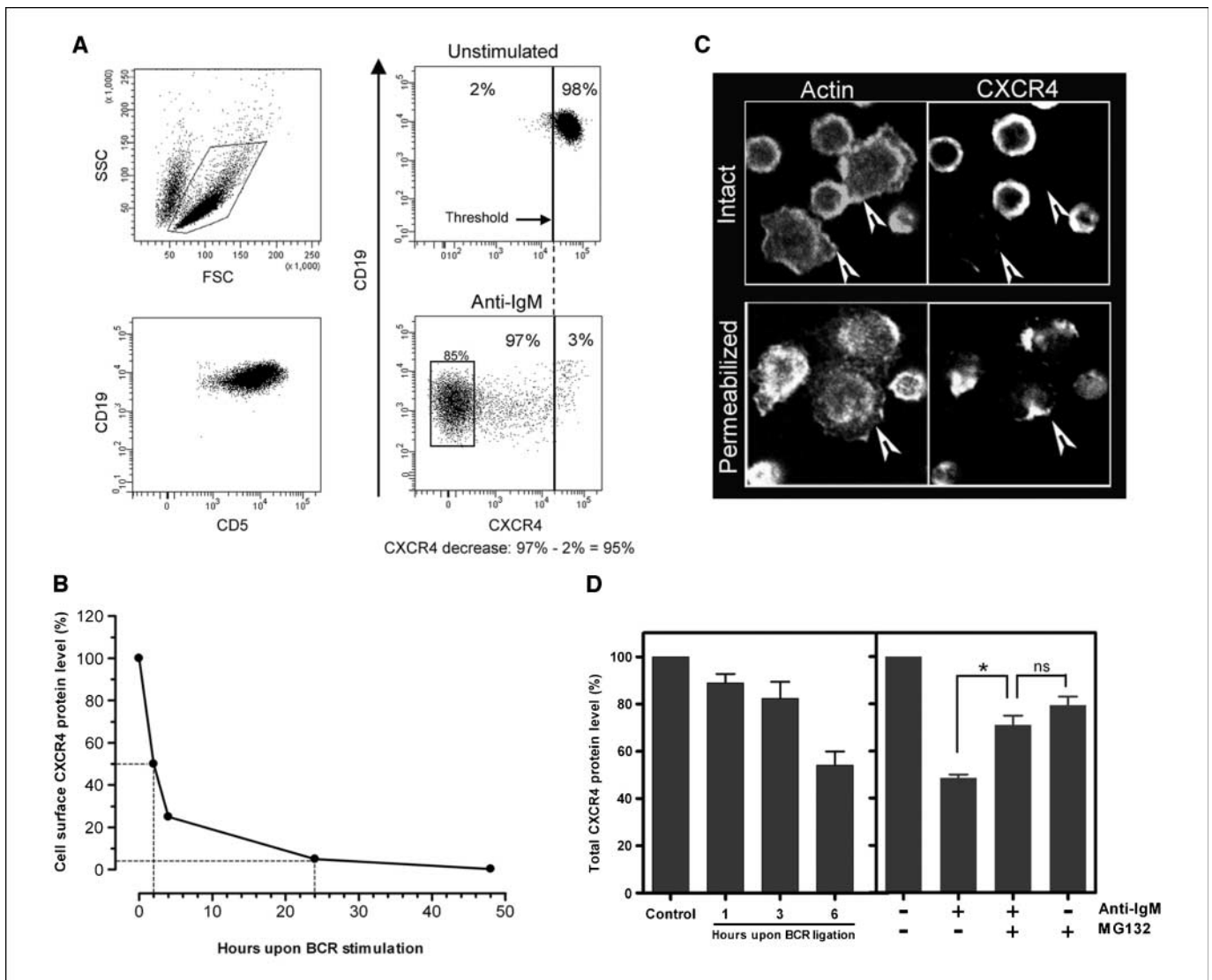


Figure 1. BCR stimulation of CLL cells leads to down-regulation of CXCR4 membrane expression. *A*, a representative flow cytometry analysis is shown (UPN 17). Freshly isolated lymphocytes were gated in a FCS/SSC dot plot and CD19/CD5 coexpression was analyzed indicating the purity of malignant cells (*left*). CLL cells were incubated for 48 h in the presence (*anti-IgM*) or absence (*unstimulated*) of immobilized anti-IgM antibodies and CXCR4/CD19 expressions were analyzed (*right*). The CXCR4 decrease represented the percentage of cells down-regulating CXCR4 upon BCR ligation. *B*, CLL cells were stimulated with anti-IgM and analyzed for their cell surface CXCR4 content by flow cytometry based on median fluorescence intensity. *C*, immunofluorescence analysis of CXCR4 down-modulation in response to BCR ligation. Cells were plated on anti-IgM-coated glass coverslips for 30 min and stained with phalloidin and anti-CXCR4 antibody either in intact or permeabilized cells. *Arrows*, BCR-activated cells (magnification, $\times 63$). *D*, CLL cells were subjected to anti-IgM stimulation for various period of time (*left*) or for 6 h in the presence of MG132 (5 $\mu\text{mol/L}$; *right*). Total CXCR4 content was analyzed in permeabilized cells by flow cytometry based on median fluorescence intensity ($n = 2$). *, $P < 0.05$; ns, not significant.

analysis reveals that progressive disease is closely linked to the proportion of CLL cells able to respond to BCR ligation in a given patient.

Materials and Methods

CLL B-cells samples. Peripheral blood mononuclear cells were freshly isolated from 30 previously untreated patients after informed consent and validation by the local research ethics committee from the Avicenne Hospital, in accordance with the Declaration of Helsinki. In this cohort, 27 patients were Binet stage A CLL, 3 were stage B or C (UPN 28,18, 25). CLL diagnosis was relied on typical morphology and RMH score of ≥ 4 immunophenotype.

Isolation of CLL cells and culture. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood using Roset Sep kit and purity was verified by flow cytometry (T and natural killer cells, $<2\%$). CLL cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL

streptomycin, and 2 mmol/L L-glutamine. Upon BCR stimulation, CLL cells were cultured at 2×10^6 cells/mL in four-well plates coated with rabbit anti-IgM antibody (10 $\mu\text{g/mL}$; Jackson ImmunoResearch; ref. 22).

Flow cytometry analysis. Protein membrane expression was analyzed by flow cytometry (FACS-CANTO; Becton Dickinson) following labeling with the indicated antibody. Conjugated-antibodies included anti-CXCR4-APC (clone 12G5), anti-CD62L-FITC (clone SK11), anti-CD19-PerCPCy5.5 (clone SJ25C1), and anti-CD5-PECy7 (clone L17F12; BD Biosciences). Matching isotype monoclonal antibodies (IgG) conjugated to APC/FITC/PerCP/PE served as control (BD Biosciences). Lymphocytes were gated in a FSC/SSC dot plot. Almost 100% of gated lymphocytes were malignant CLL cells, as shown by the coexpression of CD19 and CD5 markers (see Fig. 1A). Data acquisition and analysis were performed using BD FACSDiva software. Overall CXCR4 protein content was measured by flow cytometry in CLL cells previously permeabilized using the Fix & Perm kit (Invitrogen).

The effect of BCR engagement on membrane CXCR4/CD62L protein expression was measured by determining the percentage of CLL cells present

below and above a threshold discriminating CXCR4/CD62L-negative and CXCR4/CD62L-positive cells, respectively. The threshold was arbitrarily set up case-by-case on unstimulated cells to include at least 95% positive cells at the left shoulder of the peak. The level of BCR-induced response was expressed as the percentage of cells decreasing CXCR4 or CD62L and will be called "CXCR4 decrease" or "CD62L decrease." This value was calculated as follows: (% of negative cells after anti-IgM stimulation) – (% of negative cells before anti-IgM stimulation). This type of quantitative analysis was chosen to take into account the cellular heterogeneity in the BCR response in a given patient.

Chemotaxis assay. Chemotaxis assays were performed as previously described (23). CLL cells (5×10^5) were either stimulated for 24 h with an anti-IgM or left unstimulated. Cells were resuspended in RPMI 1640 containing 0.5% bovine serum albumin and dispensed in the upper chamber of a Transwell culture insert (5 μ m pore size; Corning Costar). Inserts were then transferred into wells containing RPMI supplemented with CXCL12 (100 ng/mL). After incubation for 6 h, cells present in the upper and lower chambers were collected. Transmigrated CLL cells were then counted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) for 1 min at 60 μ L/min to obtain a median of the relative number of total transmigrated cells. Cell surface CXCR4 expression of input cells, nonmigrated, and transmigrated cells was also analyzed by flow cytometry. All assays were performed in duplicate.

Detection of soluble CD62L by ELISA. Supernatants from CLL cells (2×10^6 /mL) either stimulated or not with an anti-IgM were collected and

concentrated (Amicon Ultra-4; Millipore). Soluble CD62L released into the supernatants were measured using a human sCD62L sandwich ELISA (Bender Medsystems).

In vitro adhesion assay of CLL cells to lymphatic endothelial cells. The *in vitro* adhesion assay was adapted from Akeson and colleagues (24). The murine endothelial cell line SVEC4-10 (American Type Culture Collection), which was recently characterized as lymphatic endothelial cells (25), was seeded at 1.5×10^5 cells per well onto Lab-Tek chamber slides (Nunc) in DMEM/10% FCS and allowed to adhere overnight. CLL cells either prestimulated with an anti-IgM (24 h) or unstimulated were labeled for 20 min at 37°C in RPMI with the fluorescent cell-permeant dye Cell Trace calcein green or Cell Trace calcein red-orange (Invitrogen), respectively. BCR-stimulated and unstimulated fluorescent cells (2.5×10^6 each) were mixed in RPMI 1640/10% FCS and added together onto the endothelial cell layer. After incubation for 2 h at 37°C, the nonadherent CLL cells were washed off. Remaining adherent cells were fixed, and 10 fields from duplicate chamber slides (average of 500 cells/field) were photographed under fluorescent microscope (magnification, $\times 10$). Red and green fluorescence were separately quantified using the Pixcavator IA 3.3 software (Intelligence Perception Co.). CLL cell-labeling efficiency using the two fluorescent dyes was measured both in BCR-stimulated and unstimulated cells. A high (90%) and identical labeling efficiency was observed in all tested combinations.

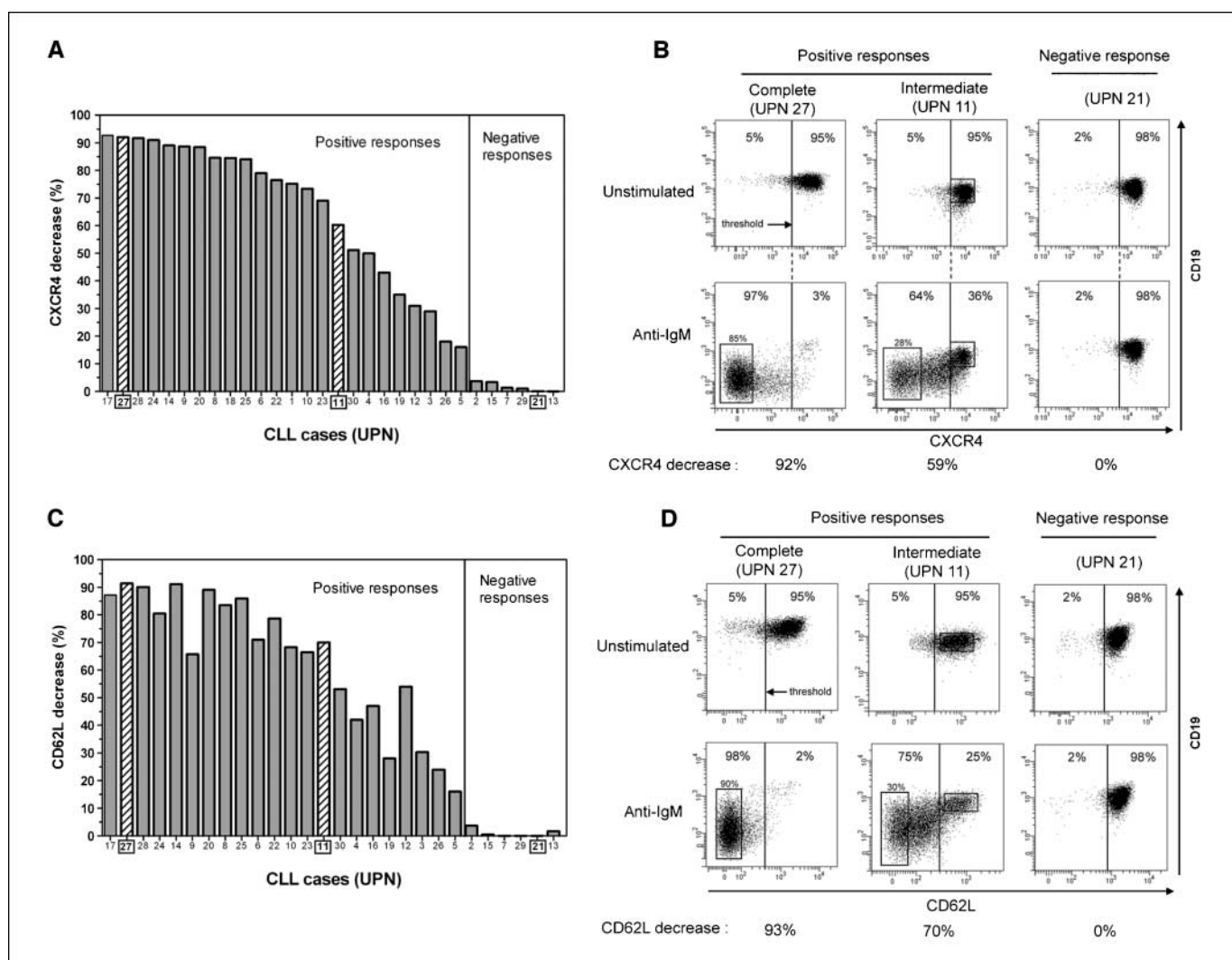


Figure 2. CXCR4 and CD62L down-regulation following BCR ligation is highly variable among CLL patients. CXCR4 decrease (A and B) and CD62L decrease (C and D) upon BCR engagement was measured on a series of CLL cases (48 h of anti-IgM stimulation). Representative flow cytometry analyses of different profiles of CXCR4 decrease (B) and CD62L decrease (D) are shown.

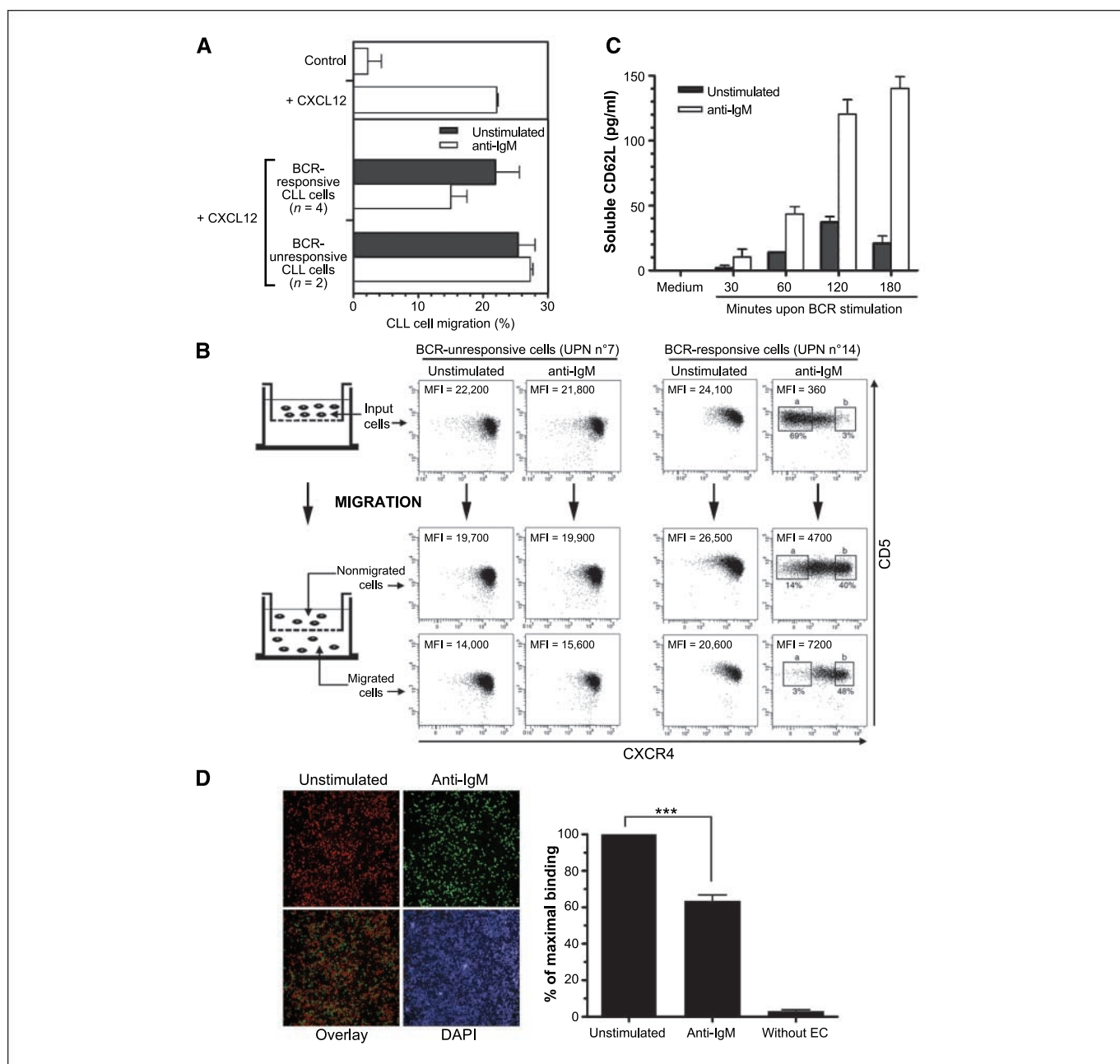


Figure 3. BCR engagement led to a reduction in both migration of CLL cells toward CXCL12 and adhesion to lymphatic endothelial cells. **A** and **B**, CLL cells either stimulated (24 h) or left unstimulated were subjected to migration assay for 6 h. **A**, transmigrated cells were counted to determine the percentage of the input cells that migrated into the lower chamber; *, $P = 0.02$. **B**, input, nonmigrated, and transmigrated cells were stained with anti-CXCR4 and anti-CD5 and analyzed by flow cytometry. FACS analyses of two representative BCR-induced responses are shown. *Inserts a* and *b*, delineated nonexpressing and reexpressing CXCR4 cells, respectively. *MFI*, median fluorescence intensity. **C**, CD62L is shed into supernatants from CLL cells during exposure to anti-IgM. **D**, an adhesion assay was performed to measure CLL cell binding to lymphatic endothelial cells. Unstimulated CLL cells (*red fluorescence*) and anti-IgM prestimulated (24 h) CLL cells (*green fluorescence*) were mixed, loaded in the same chamber slide onto the SVEC4-10 lymphatic endothelial cell layer, and allowed to adhere for 2 h. After washing, red and green fluorescent CLL cells were separately quantified as described in Materials and Methods. *Left*, a representative assay is shown (magnification, $\times 10$). *Right*, the results of three independent experiments are shown as mean percentage of maximal binding \pm SE. ***, $P < 0.0001$ using paired *t* test. Very few CLL cells adhere to the Lab-Tek plastic slide in absence of endothelial cell (without EC).

Immunofluorescence microscopy. Glass coverslips were coated overnight at 4°C with rabbit anti-human IgM antibody ($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$). CLL cells were plated onto the coated surface and incubated at 37°C for 30 min. After fixation, cells were either left intact or permeabilized with 0.1% Triton and stained with biotin anti-human CXCR4 antibody (Clone 12G5; BioLegend) and streptavidin Alexa Fluor 647 conjugate (Invitrogen). Filamentous actin was stained with rhodamin-phalloidin (Sigma). Images

were acquired by confocal laser-scanning microscopy with high numerical aperture lens (63×2.8 ; Leica TCS SP2).

Statistics. When comparing data or CLL subgroups, P values were calculated using the unpaired *t* test (two-tailed, 95% confidence interval). For PFS study, statistical analyses were performed using the free software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; ref. 26).

Results

BCR stimulation of CLL cells leads to down-regulation of CXCR4 membrane expression. The effect of BCR engagement on the cell surface expression of CXCR4 was investigated by flow cytometry on freshly isolated CLL cells after stimulation with immobilized anti-IgM for 48 h. Quantitative analysis of the BCR-induced response was performed as described in Materials and Methods. Anti-IgM stimulation induced a strong decrease of CXCR4 membrane expression (Fig. 1A). In the case highlighted, CXCR4 surface expression was decreased in 95% of the cells in response to BCR engagement (CXCR4 decrease, 95%). The strong down-regulation of CXCR4 was also associated with a concomitant but to a lesser extent, down-regulation of CD19 on the same subset of cells. As expected, the subset of cells down-regulating both CXCR4 and CD19 up-regulated both CD71 and CD23 expression (data not shown) due to the activation process resulting from BCR engagement (27, 28). The effect of immobilized anti-IgM on CXCR4 down-modulation was next compared with that of soluble anti-IgM. BCR stimulation with a soluble anti-IgM did not induce any change in cell surface CXCR4 level indicating that a continuous

antigenic stimulation, more representative of *in vivo* conditions, is likely to be necessary to induce this effect (Supplementary Fig. S1).

Down-regulation of CXCR4 in response to BCR ligation mainly occurs through a clathrin-mediated receptor internalization. We next investigated whether BCR-induced CXCR4 down-regulation could be attributed to an internalization process of the receptor. Kinetic studies indicated that ~50% of the cell surface CXCR4 down-regulation was achieved within the first 2 hours after BCR stimulation and maximal effect was reached after 24 hours of culture (Fig. 1B). BCR-induced cell surface decrease of CXCR4 was further analyzed by immunofluorescence on anti-IgM-coated coverslip. BCR-activated CLL cells were distinguished from inactivated cells using staining with phalloidin that highlighted actin-based cell spreading induced by clustering the BCR (29). After 30 minutes of stimulation, cell surface CXCR4 staining on intact cells was significantly decreased in spreading B cells compared with nonspreading/nonactivated cells (Fig. 1C, *top*). Concomitantly, in permeabilized cells, punctuated intracellular fluorescence increased markedly in spreading cells (Fig. 1C, *bottom*). Anti-IgM triggering effect

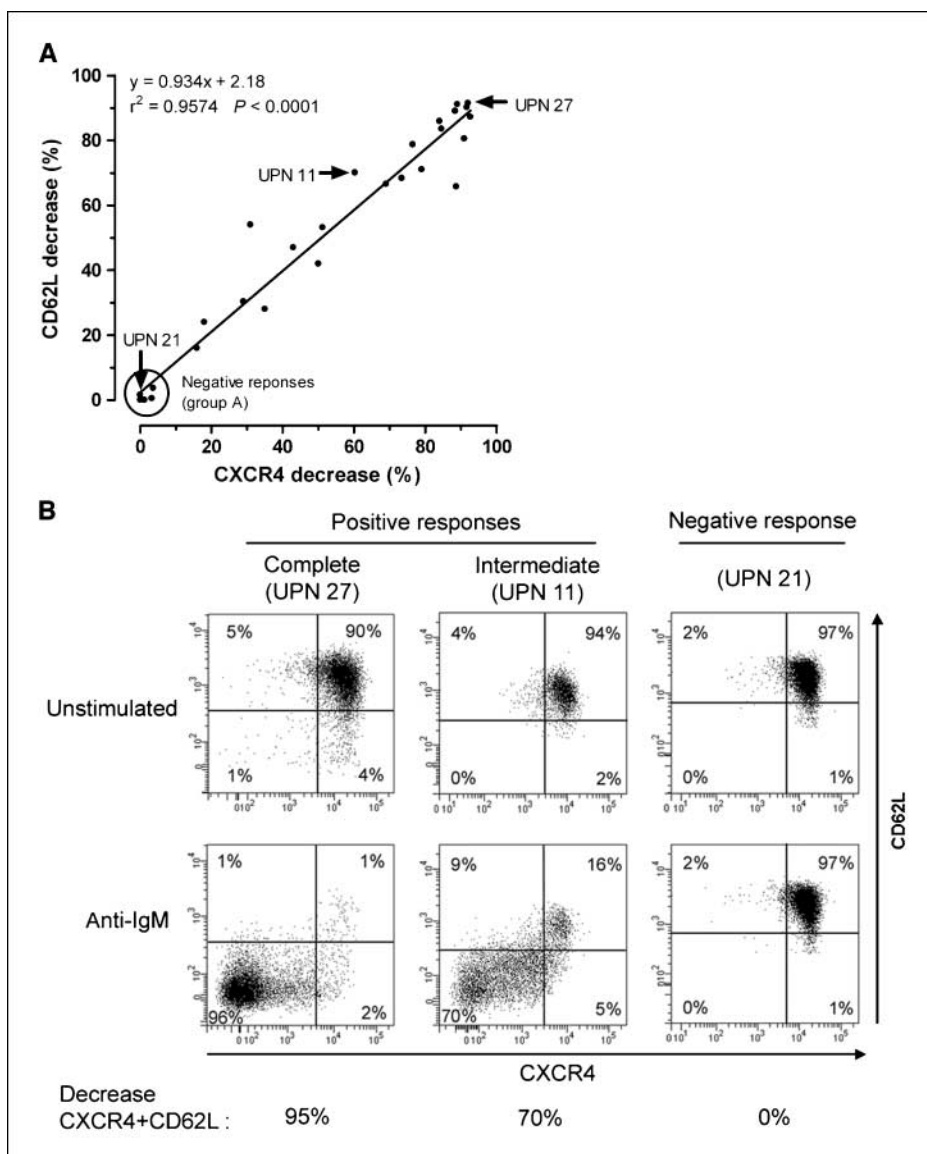


Figure 4. Down-regulation of CXCR4 and CD62L occurred simultaneously in response to BCR ligation. **A**, correlative diagram between BCR-induced CXCR4 and CD62L decrease. **Group A**, patients whose cells showed an absence of BCR-induced decrease of both CXCR4 and CD62L (negative response). **B**, FACS analysis of the CXCR4/CD62L coexpression in representative cases displaying positive (UPN 27, UPN 11) or negative (UPN 21) BCR-induced response.

Table 1. Biological variables of the 30 CLL cases (UPN)

UPN	CD62L*	CXCR4*	VH [†]	IgVH mutational status [‡]	ZAP-70 [§]	CD38	Cell survival [¶]
27	93	92	VH1-69	98	Pos	Neg	Pos
14	91,1	89	VH1-69	100	Pos	Pos	Pos
28	90,1	91,7	VH4-59	98	Pos	Neg	Pos
20	89	88,4	VH3-33	96	Neg	Neg	Pos
18	ND	84,5	VH4-39	99	Pos	Neg	Neg
17	87,2	95	VH3-30	89	Neg	Neg	Neg
25	85,9	84	VH3-21	100	Pos	Pos	Pos
8	83,5	84,6	VH2-5	100	Pos	Pos	Pos
24	80,5	91	VH1-69	95	Pos	Pos	Neg
22	78,7	76,5	VH3-23	97,7	Neg	Neg	Pos
6	71	79	VH4-34	95	Pos	Neg	Pos
1	ND	75,2	VH3-48	95	Neg	Neg	Neg
11	70	59	VH6-1	96	Neg	Neg	Pos
10	68,3	73,4	VH4-44	99	Pos	Pos	Pos
23	66,5	69	VH3-33	92	Neg	Neg	Neg
9	65,7	88,7	VH1-69	100	Pos	Pos	Pos
12	54	31	VH3-30	100	Pos	Pos	Pos
30	53,1	51,2	VH4-b	94	Neg	Neg	Pos
16	47	43	VH3-7	94	Neg	Neg	Pos
4	42	50	VH3-72	97	Neg	Neg	Neg
3	30,3	29	VH3-23	97	Neg	Neg	Neg
19	28	35	VH4-34	97	Neg	Pos	Neg
26	24	18	VH1-69	99	Neg	Neg	Pos
5	16	16	VH4-34	91	Neg	Neg	Neg
Group A							
2	3,7	3,7	VH3-30	97	Neg	Neg	Neg
13	1,6	0	VH4-34	95	Neg	Neg	Neg
15	0,5	3,3	VH1-3	85	Neg	Neg	Neg
29	0	1	VH3-48	91	Neg	Neg	Neg
7	0	1,3	VH3-23	94	Neg	Neg	Neg
21	0	0	VH3-7	93	Neg	Neg	ND

NOTE: Shaded boxes represent unfavorable factors.

Abbreviation: ND, not determined.

* BCR-induced CXCR4 or CD62L decrease (%).

[†] VH sequence.

[‡] IgVH mutational status (%homology to the closet germ line VH gene).

[§] Presence (*pos*) or absence (*neg*) of ZAP70 expression verified by reverse transcription-PCR (R. Letestu, unpublished data).

^{||} Cell surface CD38 expression (%) verified by flow cytometric analysis. (Pos, ≥10%; Neg, <10%).

[¶] *In vitro* BCR-induced cell survival signal. Positive survival signal: inhibition of spontaneous apoptosis of >10% and increase of metabolic activity of >25%; Deglesne et al., 2006.

was next performed in hypertonic media (0.6 mol/L sucrose) inhibiting clathrin-coated pit pathway involved in the internalization of various receptors (30). As shown in Supplementary Fig. S2, the presence of sucrose inhibited the BCR-triggered decrease of CXCR4 cell surface expression. Furthermore, 15% to 20% of CXCR4 protein level was recovered at the cell membrane when CLL cells were stimulated for 24 hours and subsequently released from anti-IgM stimulation for a 6-hour period of time (Supplementary Fig. S3). BCR-induced transcriptional down-regulation was ruled out by CXCR4 mRNA quantitation as evidenced by a <2-fold decrease of CXCR4 mRNA synthesis after a 24-hour anti-IgM exposure (Supplementary Fig. S4). Analysis of the change in overall CXCR4 protein content after BCR engagement indicated that almost 50% of the CXCR4 protein content disappeared after a 6-hour BCR stimulation (Fig. 1D). This protein depletion seems to occur through a proteasome-mediated degradation mechanism since treatment with the

proteasome inhibitor MG132 significantly reversed this process. Taken together, these data show that BCR stimulation results in a strong decrease in CXCR4 membrane expression mainly through a clathrin-mediated receptor internalization.

CXCR4 and CD62L decrease in response to BCR ligation are highly variable among CLL patients. The CXCR4 decrease upon anti-IgM stimulation was further evaluated on a series of 30 previously untreated CLL cases and the extent of the decrease was quantified as described in paragraph 1. As shown in Fig. 2A, BCR stimulation induced a highly variable CXCR4 decrease within the CLL cases examined, ranging from >90% of CLL cells down-regulating CXCR4 expression to an absence of modulation of CXCR4 cell surface expression. These results allowed us to discriminate a group of six cases (UPN 2-7-13-15-21-29) exhibiting a BCR-induced CXCR4 decrease inferior to 5% called "negative response," whereas the other cases (24 of 30) displayed a marked decrease of CXCR4 (>5%) after BCR

engagement and was called “positive response.” Interestingly and as exemplified in Fig. 2B, two profiles of responses were observed among BCR induced positive responses and corresponded either to a complete down-regulation of CXCR4 (UPN 27) or to a partial down-regulation called intermediate response (UPN 11). The intermediate response was characterized by a mixture of cells with differential capability of internalizing CXCR4 upon anti-IgM stimulation. As seen in the Fig. 2B (middle), 36% of the overall cell population of UPN 11 maintained an identical level of CXCR4 membrane expression, whereas 28% had no remaining CXCR4 expression at the membrane. CXCR4 protein expression on unstimulated cells was not significantly different between groups displaying either responsiveness or unresponsiveness to BCR ligation (data not shown). Altogether, these results indicate that the ability of CLL cells to down-regulate CXCR4 in response to BCR engagement was highly variable among CLL patients and highlight the heterogeneous capacity of the cell population to respond to BCR in a given patient.

We next considered the effect of BCR engagement on the cell surface expression of CD62L (L-selectin) on the same series of CLL cases. BCR-induced CD62L down-regulation was also variable among cases (Fig. 2C), and similarly to CXCR4, two groups of response were identified, i.e., a group of six cases (UPN 2-7-13-15-21-29) showing no modulation of CD62L expression upon BCR stimulation (CD62L decrease, <5%; negative response), whereas the remaining cases (22 of 28) down-regulated CD62L upon BCR engagement (CD62L decrease, >5%; positive response) but to a variable extent. As observed for CXCR4, two profiles of BCR-induced response were indeed observed among the positive responses (Fig. 2D): a complete decrease of CD62L expression (UPN 27) or an intermediate decrease (UPN 11).

BCR-responsive CLL cells displayed a reduction in both migration toward CXCL12 and adhesion to lymphatic endothelial cells. Because BCR stimulation led to a CXCR4 down-regulation, we considered BCR impact on CXCL12-mediated chemotaxis of CLL cells. Figure 3A shows that the average proportion of CLL cells that migrated to lower chamber containing CXCL12 is 22% of input cells. The anti-IgM prestimulation of

CLL cells unresponsive to BCR ligation did not modify their migratory capacity (Fig. 3A), and a similar CXCR4 expression profile was observed for both nonmigrated and transmigrated cells (Fig. 3B, left). Conversely, CLL cells that strongly decreased CXCR4 upon BCR ligation exhibited a reduced ability to migrate (Fig. 3A) and remained mostly in the higher chamber (Fig. 3B, right, inset a). Almost half of migrated cells corresponded to CXCR4-reexpressing cells (Fig. 3B, right, inset b) due to surface readdressing of CXCR4 in absence of further anti-IgM stimulation as previously described.

We next showed that BCR-induced decrease of cell surface CD62L resulted from shedding of the protein as shown by a time-dependent increase of soluble CD62L in CLL cell supernatant during anti-IgM exposure (Fig. 3C). Because CD62L is involved in the binding of B-lymphocytes to lymphatic endothelium (14), we considered the *in vitro* BCR impact on CLL cell adhesion to the lymphatic endothelial cell line SVEC4-10 by using a static adhesion assay. As shown in Fig. 3D, lymphocyte binding to lymphatic endothelial cells was reduced by $37\% \pm 3\%$ when CLL cells were prestimulated with an anti-IgM ($P < 0.0001$). Taken together, these results indicate that CLL cells down-regulating CXCR4 and CD62L in response to BCR engagement exhibit a decreased ability to migrate toward CXCL12 and to adhere to lymphatic endothelial cells.

BCR-dependent decrease of CXCR4 and CD62L surface expression are strongly related. Because BCR ligation induced both CXCR4 and CD62L down-regulation with similar profiles, we assessed whether these responses might happen in the same subset of cells. As shown in Fig. 4A, CXCR4 and CD62L decrease in response to BCR ligation appeared strikingly correlated among cases (slope, 0.934; $r^2 = 0.9574$; $P < 0.0001$). As expected, this analysis underlined the previously identified subgroup of six patients (group A, UPN 2-7-13-15-21-29) with almost no BCR-dependent decrease of CXCR4 and CD62L (<5%), whereas the remaining cases showed variable but similar extent of down-regulation of both proteins. Figure 4B illustrates the different coregulation of the two proteins following BCR engagement: complete down-regulation (UPN 27), down-regulation of neither proteins (UPN21), and intermediate down-regulation (UPN 11). These intermediate cases were characterized by a mixture of cells decreasing both proteins (70% of the cells in this case) and cells decreasing neither of them (16% of the cells in this case). These results support a BCR-induced decrease of CXCR4 and CD62L occurring simultaneously in the same subset of cells leading to the interpretation that the extent of the down-regulation reflects the percentage of cells with a capacity to respond to BCR ligation.

BCR-induced decrease of CXCR4 and CD62L are indicators of the progressive disease. We previously reported that survival response to BCR ligation correlated with unfavorable markers and was restricted to progressive CLL cases (22). We thus investigated if the extent of CXCR4 or CD62L down-regulation upon BCR stimulation was of prognostic significance, and we found for both proteins a significant correlation with either immunoglobulin variable heavy-chain (IGVH) mutational status ($P = 0.001$) or ZAP70 status ($p \leq 0.03$) or BCR-induced *in vitro* cell survival response ($P \leq 0.01$; Supplementary Table S1). CLL cells isolated from group A cases displayed mutated IGVH sequence, ZAP70-negative status, CD38-negative status, and did not display an increased survival in response to BCR ligation (Table 1). Conversely, over 60% of cases whose cells exhibited a strong level ($\geq 80\%$) of BCR-induced CXCR4 decrease displayed unmutated IGVH sequence ($n = 6/9$), ZAP70 expression ($n = 7/9$), and a

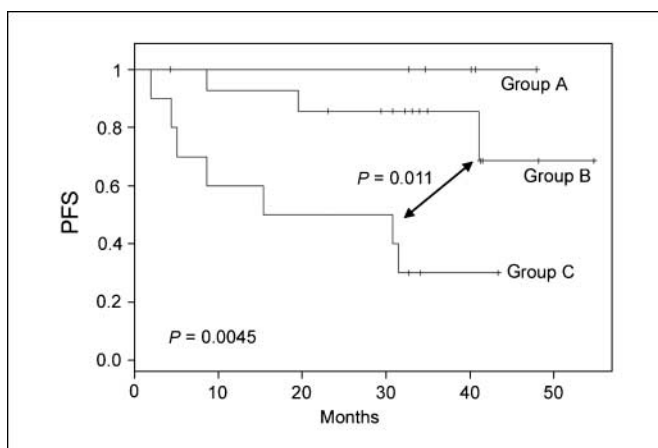


Figure 5. BCR-induced CXCR4 decrease is associated with a risk of disease progression. PFS curves (Kaplan-Meier) according to BCR-induced CXCR4 decrease. PFS was measured from diagnosis to first line treatment, death, or last follow-up. Group A ($n = 6$): CXCR4 decrease, <5%; group B ($n = 14$): $5\% \leq$ CXCR4 decrease < 80%; group C ($n = 10$): CXCR4 decrease, $\geq 80\%$. P values were calculated using log-rank test.

BCR-dependent survival response ($n = 6/9$). Furthermore, using a standard Cox analysis, we found a significant correlation between the extent of BCR-induced CXCR4 decrease and progression-free survival (PFS; $P = 0.039$; data not shown). We observed previously that there were essentially three groups of patients according to the ability of the cells to down-regulate CXCR4 after BCR ligation. We set up arbitrary cutoffs to better visualize the impact on PFS: in group A ($n = 6$), almost no cells were able to down-regulate CXCR4 in response to BCR ligation (CXCR4 decrease, $<5\%$); in group C ($n = 10$), the majority of the cells did (CXCR4 decrease, $\geq 80\%$); and in group B ($n = 14$), only a subset of the cells were able to do so. The PFS was significantly different among the three groups by log-rank analysis ($P = 0.0045$; Fig. 5). In group A, no patient experienced any disease progression. In contrast, PFS was shorter in the two other groups and significantly different in group C (median PFS, 23.1 months) versus group B (median PFS, not reached; $P = 0.011$). In conclusion, the ability of CLL cells to down-regulate CXCR4 and CD62L in response to BCR ligation correlates with unfavorable biological markers and the extent of this BCR-induced response is associated with a significantly shorter PFS.

Discussion

We previously showed that BCR engagement promoted *in vitro* CLL cell survival in patients with progressive disease and unfavorable prognostic markers only (22). Here, in primary CLL cells, we show that *in vitro* BCR engagement led to the decrease of CXCR4 and CD62L membrane expression, in particular in cells from patients with unfavorable prognostic factors and at risk of disease progression.

BCR-induced CXCR4 decrease was the consequence of the internalization of the chemokine receptor as evidenced by the appearance of intracellular CXCR4 following anti-IgM exposure, the inhibition of BCR-induced down-regulation in the presence of sucrose, and the rapid surface recovery 6 hours after cells were released from BCR stimulation. Moreover, we ruled out that BCR-induced decrease of membrane CXCR4 could be related to a transcriptional down-regulation, and this finding is in accordance with a recent work showing that BCR engagement using the same conditions of stimulation led to a moderate (1.5-fold) decrease of CXCR4 gene expression in CLL cells (31). In addition, we showed that BCR engagement promotes CD62L shedding from the cell surface of CLL cells. In other models, BCR engagement has been shown to induce CXCR4 internalization through a protein kinase C-dependent mechanism (32). Similarly, a protein kinase C-dependent shedding of CD62L was observed in B cells activated by formyl peptides and phorbol 12-myristate 13-acetate (33–35). Therefore, in CLL cells, antigen-driven down-regulation of CXCR4 and shedding of CD62L may occur through a common protein kinase C-dependent signaling pathway originating from the BCR. This interpretation is in line with the extremely tight correlation observed between the extent of CXCR4 and of CD62L down-regulation. Importantly, our results strongly suggest an underlying high heterogeneity of cellular capacity to respond to IgM ligation in a given patient, thus pointing out the existence of various CLL cell subclones with differential ability to respond to BCR engagement.

The capacity of CLL cells to down-regulate both CXCR4 and CD62L in response to BCR ligation was highly variable among CLL patients and allowed the discrimination of two groups of patients. One group of six cases had no CXCR4/CD62L down-regulation nor

increased cell survival after *in vitro* BCR ligation. These cases were all stable stage A CLL, harbored IGVH mutated genes, no ZAP-70 expression, and none of them experienced disease progression to date. In contrast, in a larger group exhibiting variable but significant responsiveness to BCR engagement, the intensity of BCR-induced CXCR4 down-regulation was correlated with a shorter PFS, indicating that disease progression was closely linked to the percentage of BCR-responsive cells. Interestingly, even if all ZAP70-positive cases were able to down-regulate CXCR4, a least two ZAP70-negative cases also did, confirming our previous finding that ZAP-70 is dispensable for BCR downstream signaling (22). Similarly, we observed that BCR-responsive cells only displayed an increased Syk activation following BCR engagement (Supplementary Fig. S5).

Importance of BCR signaling capacity after antigen stimulation in CLL disease progression is now well established (20, 22, 36–38). Functionally, cells down-regulating CXCR4 and CD62L in response to BCR engagement displayed a reduction in both migration toward CXCL12 and adhesion to lymphatic endothelial cells. Our data are in line with the CXCR4 internalization and subsequent impairment of CXCL12-mediated chemotaxis after BCR engagement in DT40 cell line (32). CD62L seems to be critical for B-lymphocyte exit from LNs through binding to lymphatic endothelium (17). Germinal center antigen-experienced B cells lack cell surface CD62L and fail to adhere to endothelium into LNs (39). In addition, CXCR4-deficient activated B-cells harbor an aberrant migratory behavior within spleen and LNs (15, 16) and BCR engagement through antigen-bearing dendritic cells leads to migration arrest and extrafollicular accumulation of B-cells into LNs (40). Altogether, these observations indicate that BCR-triggered down-modulation of CXCR4 and/or CD62L profoundly alters B-lymphocyte trafficking within secondary lymphoid organs. In CLL, our observations led to the hypothesis that BCR ligation trapped BCR-responsive CLL cells within the LNs. After entering the LNs, BCR engagement leads BCR-responsive CLL cells to behave like antigen-stimulated normal B cells by dramatically reducing their motility through CXCR4 down-regulation and shutting down their exit program through CD62L down-regulation. These cells remain in close contact with the microenvironment and antigenic stimulation and are prone to proliferate, resulting into enlarged LNs. Conversely, BCR-unresponsive CLL cells are able to exit rapidly from the lymphoid organs and recirculate, as most normal B-cells do because of their inability to detect a specific antigen (40). Thus, by coupling CXCR4/CD62L down-regulation and survival signal, BCR signaling capacity favors the maintenance of a proliferative pool within LNs and contributes to disease progression. Therefore targeting BCR signaling capacity seems of therapeutic interest.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 12/14/08; revised 5/7/09; accepted 5/30/09; published OnlineFirst 8/4/09.

Grant support: Grants from Ligue Contre le Cancer-Comité Seine St Denis, Cent pour Sang la vie, and Association pour la Recherche contre le Cancer. P.A. Deglesne and N. Chevallier were recipients of Société Française d'Hématologie and Fondation de France fellowships, respectively.

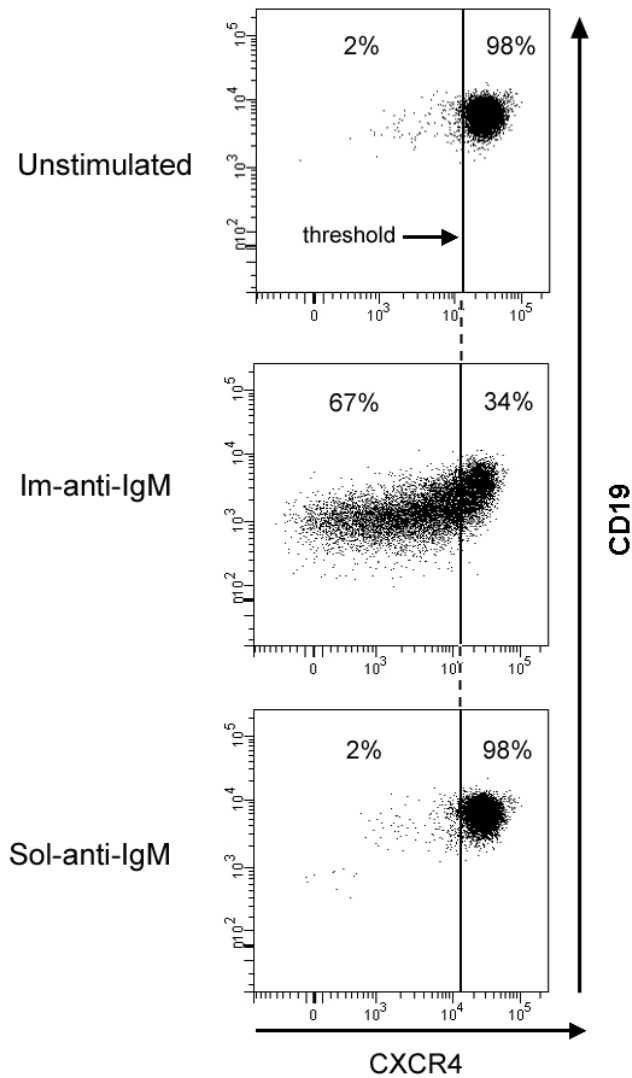
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Dr. Elisabetta Dondi for immunofluorescence analysis and Pr. Vincent Levy for PFS analysis.

References

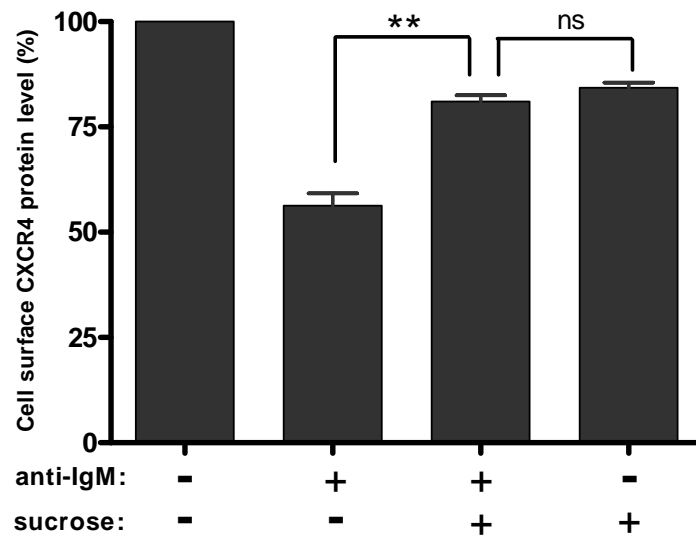
1. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-34.
3. Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004;45:2365-72.
4. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:380-8.
5. Orsini E, Guarini A, Foa R. Accessory cells, cytokine loops and cell-to-cell interactions in chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000;4:73-98.
6. Chanan-Khan A, Porter CW. Immunomodulating drugs for chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol* 2006;7:480-8.
7. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999;94:3658-67.
8. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000;96:2655-63.
9. Tichioni M, Essafi M, Jeandel PY, et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 2007;26:7081-91.
10. Burger M, Hartmann T, Krome M, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;106:1824-30.
11. Zeng Z, Samudio IJ, Munsell M, et al. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3113-21.
12. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia* 2009;23:43-52.
13. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127-59.
14. Allen CD, Ansel KM, Low C, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004;5:943-52.
15. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 2001;194:45-56.
16. Cyster JG. Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* 2003;194:48-60.
17. Irjala H, Johansson EL, Grenman R, Alanen K, Salmi M, Jalkanen S. Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med* 2001;194:1033-42.
18. Reif K, Ekland EH, Ohl L, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 2002;416:94-9.
19. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003;21:841-94.
20. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004;103:4389-95.
21. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;105:4820-7.
22. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* 2006;66:7158-66.
23. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829-33.
24. Akeson AL, Woods CW. A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J Immunol Methods* 1993;163:181-5.
25. Ledgerwood LG, Lal G, Zhang N, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 2008;9:42-53.
26. software R. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>. Accessed November 24, 2008.
27. Neckers LM, Yenokida G, Trepel JB, Lipford E, James S. Transferrin receptor induction is required for human B-lymphocyte activation but not for immunoglobulin secretion. *J Cell Biochem* 1985;27:377-89.
28. Jover JA, Chartash EK, Kushner B, Friedman SM, Crow MK. T helper cell-induced CD23 (BLAST-2) expression: an activation marker for the high density fraction of human B cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;53:99-112.
29. Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD. B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 2006;312:738-41.
30. Heuser JE, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 1989;108:389-400.
31. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, et al. BCR-ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgVH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 2008.
32. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, Marsh M, Kurosaki T, Ravetch JV. B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1 α chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med* 1999;189:1461-6.
33. Jung TM, Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol* 1990;144:3130-6.
34. Alexander SR, Kishimoto TK, Walcheck B. Effects of selective protein kinase C inhibitors on the proteolytic down-regulation of L-selectin from chemoattractant-activated neutrophils. *J Leukoc Biol* 2000;67:415-22.
35. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 2005;9:255-66.
36. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;101:1087-93.
37. Nedellec S, Renaudineau Y, Bordron A, et al. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 2005;174:3749-56.
38. Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, et al. B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2005;65:7328-37.
39. Reichert RA, Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. Germinal center B cells lack homing receptors necessary for normal lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 1983;157:813-27.
40. Qi H, Egen JG, Huang AY, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 2006;312:1672-6.

Supplementary Figure S1



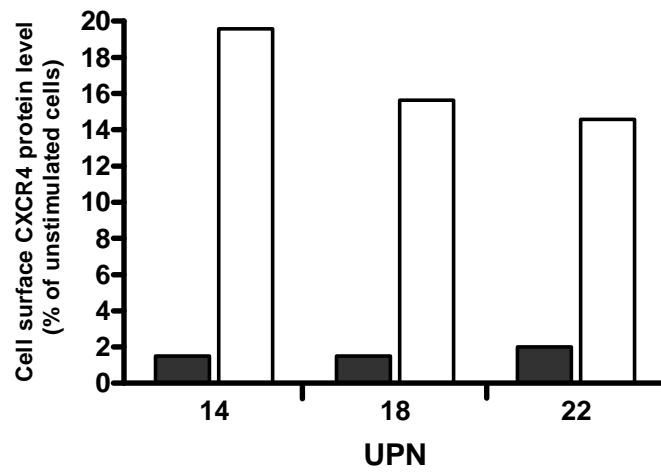
BCR-induced CXCR4 decrease using either immobilized or soluble anti-IgM. B-CLL cells (UPN 22) were subjected either to immobilized (Im-anti-IgM) or soluble (sol-anti-IgM) anti-IgM for 6h. Cell surface CXCR4 expression was analysed by flow cytometry and the "CXCR4 decrease" was quantified as described in Materials and Methods. CXCR4 decrease = 65% with immobilized anti-IgM and 0% with soluble anti-IgM. Similar results were obtained with UPN 27 and 14.

Supplementary Figure S2



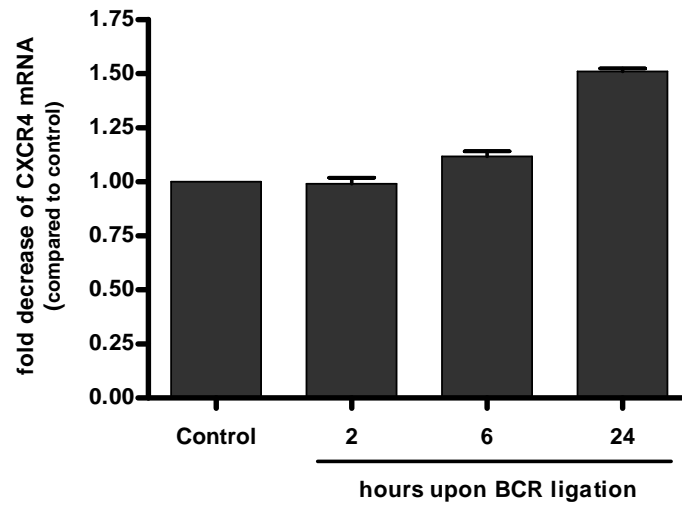
BCR-triggered decrease of CXCR4 cell surface expression is inhibited in hypertonic media. B-CLL cells were subjected to anti-IgM stimulation for 3h in the presence of 0.6 M sucrose. Cell surface CXCR4 content was analyzed by flow cytometry (MFI). Results are expressed as % of cell surface CXCR4 compared to untreated cells and represent means (\pm SD) of 3 different CLL patients. ** $p < 0.005$ using unpaired t test (two-tailed, 95% CI); ns: non significant

Supplementary Figure S3



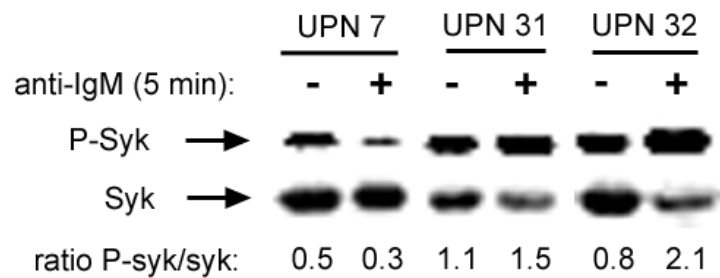
Recovery of CXCR4 cell surface expression following release of BCR engagement. B-CLL cells were subjected to anti-IgM stimulation for 24h and then released (□) or not (■) from anti-IgM stimulation for an additional period of 6h. Cell surface CXCR4 content was analysed by flow cytometry and results were expressed as % of cell surface CXCR4 compared to unstimulated cells (100%).

Supplementary Figure S4

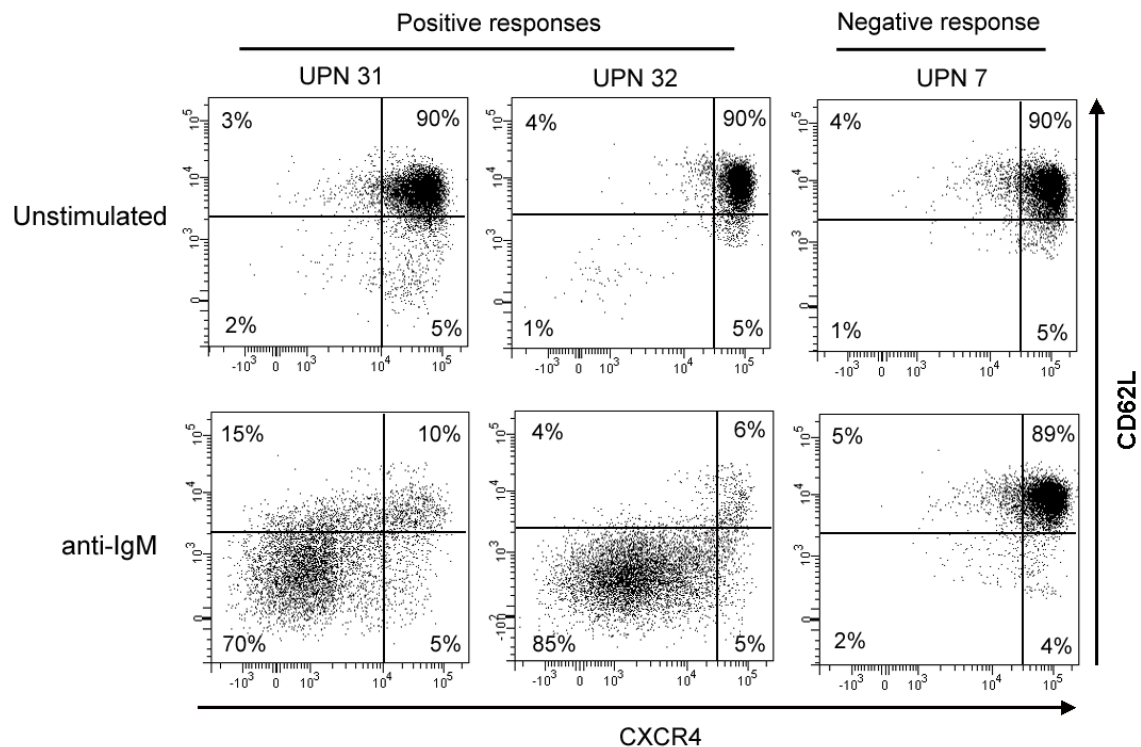


Fold-decrease of mRNA CXCR4 upon BCR engagement. B-CLL cells were subjected to anti-IgM stimulation for the indicated period of time or left unstimulated (control). RNA was extracted from whole cells and reverse transcribed using random hexamer primers and MMLV reverse transcriptase. Real-time quantitative PCR was performed using SYBR green and the ^{5'}AGC ATG ACG GAC AAG TAC AGG^{3'} and ^{5'}GAT GAA GTC GGG AAT AGT CAG C^{3'} forward and reverse CXCR4 primers, respectively. Samples were run in duplicate on the same plate. Target gene expression (CXCR4) was normalized to the reference gene Cyclophilin, then normalized to unstimulated control cells to determine the fold change.

Supplementary Figure S5



Effect of BCR engagement on the activation status of Syk. Protein extract (400µg) from unstimulated CLL cells or stimulated with an immobilized anti-IgM for 5 minutes were immunoprecipitated using the anti-p-Tyr 4G10 mAb and analysed by immunoblotting with anti-Syk for the level of phosphorylated Syk (P-Syk). Twenty-five micrograms of total cell extract were also analysed by immunoblotting for the level of expression of Syk. The ration P-Syk/Syk is also indicated. UPN 31 and 32 are representative of a BCR-induced positive response for CXCR4 and CD62L decrease while UPN 7 is representative of a BCR-induced negative response (see figure below)



Supplementary Table S1

Table S1 : Correlation of the BCR-induced CXCR4/CD62L decrease in relation to B-CLL prognostic markers				
Parameters	CXCR4¹	p value	CD62L¹	p value
ZAP70²				
Positive (n=10)	80 ± 5	0.001*	78 ± 4	0.001*
Negative (n=18)	35 ± 7		35 ± 4	
IgVH satus³				
Unmutated (n=9)	73 ± 9	0.03*	72 ± 7	0.01*
Mutated (n=19)	41 ± 8		39 ± 7	
BCR-induced cell survival⁴				
Positive (n=15)	70 ± 6	0.01*	70 ± 5	0.003*
Negative (n=12)	32 ± 10		30 ± 9	
CD38⁵				
Positive (n=8)	72 ± 8	0.08	69 ± 7	0.1
Negative (n=20)	42 ± 8		42 ± 8	

¹ BCR-induced CXCR4 or CD62L decrease (%)

² Presence (Pos) or absence (Neg) of ZAP70 expression verified by RT-PCR (R Letestu, unpublished data).

³ IgVH mutational status (%homology to the closet germ line VH gene).

⁴ Positive: inhibition of apoptosis > 10% and increase of metabolic activity > 25% upon in vitro BCR ligation.
Negative: absence of BCR-induced cell survival (Deglesne et al. (22))

⁵ Cell surface CD38 expression (%) verified by flow cytometric analysis. (Pos ≥ 10%; Neg < 10%)

VIII.2. Implication des PKD dans la downrégulation du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR des LB de Leucémie Lymphoïde Chronique

VIII.2.1. Introduction

Notre première étude a montré que la stimulation du BCR entraîne une internalisation du CXCR4 dans les LB-LLC issus de patients « **répondeurs** », conduisant à une inhibition de leurs capacités de migration *in vitro* et que cette caractéristique est associée à l'évolutivité de la maladie.

Nous avons émis l'hypothèse que cette « réponse CXCR4 » suite à la stimulation antigénique perturberait le trafic *in vivo* des LB-LLC chez les patients évolutifs, participant ainsi à leur accumulation dans le microenvironnement ganglionnaire. Ainsi, il serait tentant de proposer qu'une inhibition de la réponse CXCR4 permettrait de bloquer la downrégulation du CXCR4 induite par le BCR et de restituer les capacités de migration des LB-LLC. Cependant, aucune donnée n'a pour l'heure décrit les mécanismes impliqués dans la downrégulation du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR dans les LB-LLC.

Dans ce contexte, l'objectif de ce deuxième travail a été d'analyser les voies de signalisation activées en aval du BCR et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation du CXCR4 suite à la stimulation du BCR des LB-LLC.

VIII.2.2. Résultats

Implication des PKD dans l'internalisation BCR-induite du CXCR4 dans les LB-LLC

L'internalisation du CXCR4 dépend de sa phosphorylation sur les résidus Ser³²⁴ et Ser³²⁵ qui se trouve dans un motif « S³²⁴S³²⁵LKIL » dans la queue C-terminal du CXCR4. Il a été montré que dans les LB de poulet (lignée DT40) ce motif est important pour l'internalisation PKC dépendante du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR [262]. Nous avons montré *in silico* que les Ser³²⁴ et Ser³²⁵ seraient également phosphorylables par les PKD (voir article 2).

Dans le but de déterminer le rôle des PKC et des PKD dans l'internalisation du CXCR4 après la stimulation toujours soutenue (24h) du BCR des LB-LLC, nous avons utilisés des inhibiteurs de ces protéines, le Gö6976 (PKD et PKC α,β,γ), le Gö6983 (pan-PKC), et le GF109203X (PKC δ,β).

Nous avons montré que contrairement au Gö6983 et au GF109203X, le Gö6976 inhibe complètement l'internalisation du CXCR4. Basé sur l'inhibition différentielle de ces protéines, ces résultats suggèrent fortement que les PKD sont impliquées dans l'internalisation du CXCR4 induite par la stimulation du BCR dans les LB-LLC.

Ces résultats ont ensuite été confirmés par un inhibiteur des PKD, le CID755673 qui bloque complètement la réponse CXCR4.

Expression et activation des PKD dans les LB-LLC

La famille des PKD (PKD1, PKD2 et PKD3) jouent un rôle important dans la signalisation du BCR (Chap. VI.4.4), mais pour l'heure, il n'existe aucune donnée claire sur l'expression de ces isoformes dans les LB-LLC. Nous avons donc analysé par PCR quantitative le niveau d'expression différentielle des PKD1, 2 et 3 dans les LB-LLC à l'aide d'amorces spécifiques de chaque isoforme.

Nos résultats ont révélé une expression des isoformes PKD2 et PKD3 alors que la PKD1 est indétectable.

Du fait qu'il n'existe pas d'anticorps spécifique de la PKD1, pour montrer l'absence de l'expression protéique de la PKD1 nous avons utilisé un anticorps reconnaissant à la fois les PKD1/2 (cell signaling, voir article 2), et un témoin positif de l'expression de PKD1/2/3 (Lignée 293T).

Cet anticorps révèle une bande supplémentaire de plus haut poids moléculaire correspondant à l'expression de la PKD1 qui n'est pas retrouvée dans les LB-LLC, suggérant que comme attendu, la PKD1 n'est pas détectable dans la LLC. L'expression de PKD2 et PKD3 a ensuite été vérifiée à l'aide d'anticorps spécifiques.

Nous avons ensuite montré que la stimulation du BCR (30min) induit une augmentation de la phosphorylation des PKD sur les Ser^{744/748} qui reflète l'activation des PKD en réponse au BCR et sur la Ser⁷¹⁹ qui correspond à un site d'autophosphorylation reflétant donc l'activité kinase des PKD.

De manière intéressante, le taux d'induction de la phosphoSer^{744/748} est variable et corrélé à l'intensité de réponse CXCR4.

Enfin, nous avons montré à l'aide du LY294002, un inhibiteur pan PI3K et du CAL101 qui inhibe sélectivement l'isoforme PI3K δ majoritairement exprimée dans la LLC [240], que cette dernière est impliquée dans l'activation des PKD en réponse au BCR (30min). De plus, ces deux inhibiteurs bloquent complètement l'internalisation du CXCR4 en réponse à la stimulation soutenue (24h) du BCR.

La stimulation du BCR induit la phosphorylation du CXCR4 sur les Ser^{324/325}

Enfin, nous avons montré que la stimulation du BCR (30min) entraîne une augmentation de la phosphorylation du CXCR4 sur les Ser^{324/325} décrites comme étant importantes pour son internalisation et cet effet est diminué en présence du CID755673.

Conclusion

En conclusion, nos résultats ont permis mettre en évidence le rôle de la PI3K δ et des PKD2 et 3 dans la downrégulation de l'expression du CXCR4 en réponse au BCR.

VIII.2.3. Article 2

**BCR-dependent CXCR4 down-regulation is mediated by Protein Kinase D
in Chronic Lymphocytic Leukaemia B cells**

Stéphane Saint Georges^{1,2}, Maude Quettier^{1,2}, Vanessa Laurienté^{1,2}, Lionel Guittat^{1,2}, Vincent Lévy³, Florence Ajchenbaum-Cymbalista^{1,2,4}, Nadine Varin-Blank^{1,2}, Christine Le Roy^{1,2,†} and Dominique Ledoux^{1,2†}

¹INSERM U978, Bobigny, France,

²Université Paris 13, PRES Sorbonne Paris Cité, Labex “Inflamex”, UFR SMBH, Bobigny, France,

³Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Recherche Clinique, Bobigny, France

⁴Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d’Hématologie Biologique, Bobigny, France

† Co-seniors authors:

Dr. Christine Le Roy: UMR 978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 73 90; Fax: 33 1 48 38 73 69; E-mail: christine.le-roy@inserm.fr

Or to

Pr. Dominique Ledoux: UMR 978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 76 27; Fax: 33 1 48 38 73 69; E-mail: ledoux@univ-paris13.fr

Short title: **BCR / PKD signalling mediates CXCR4 internalization**

Text word count: XXX; Abstract word count: XXX; XXX figures and table; XXX references

Abstract:

Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) is characterized by malignant CLL cell infiltration into lymph nodes from patients with progressive disease. We previously demonstrated that *ex-vivo* sustained antigenic stimulation of the CLL B cells from progressive patients led to plasma membrane CXCR4 down-regulation, which was correlated to CLL patients' shorter progression-free survival. In this study, we undertook to elucidate the B cell receptor (BCR) signalling pathway intermediates involved in CXCR4 down-regulation. First studies demonstrated that PKDs, but not PKC, were potentially implicated in antigenic stimulation-dependent CXCR4 down-regulation in BCR-responsive CLL B cells only. Transcriptional and translational analyses of the 3 PKD isoforms in CLL B cells revealed that PKD2 and PKD3 were expressed, whereas PKD1 was undetectable. Moreover, antigenic stimulation led to differential PKD2/3 phosphorylation on serine residues 744/748 and 916 between BCR-responsive and -unresponsive CLL B cells. Interestingly, BCR-dependent phospho-Ser^{744/748}-PKD2/3 expression levels were correlated to the percentages of anti-IgM-dependent CXCR4 decrease in malignant cells. Inhibition of PKD activation with the CID755673 compound decreased phospho-Ser⁹¹⁶ but not phospho-Ser^{744/748} and blocked the negative effect of the BCR engagement on CXCR4 expression levels. Furthermore, inhibition of the PI3K- δ with the CAL-101 drug interfered with BCR-induced phospho-Ser^{744/748} PKD2/3 as well as anti-IgM-dependent CXCR4 down-regulation, suggesting that PI3K- δ was upstream of PKD in BCR signalling pathway. Finally, PKD activation upon BCR triggering resulted in CXCR4 phosphorylation in a sequence essential for its internalisation. These results demonstrated that BCR-dependent CXCR4 internalization relied on PI3K- δ and PKD2/3 activation in CLL B cells from progressive patients and suggested that phospho-Ser^{744/748} PKD2/3 might be a functional biomarker to stratified CLL patients.

Introduction:

Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) is the most common leukaemia in adults in Western countries. Considered to be mainly a disease of the elderly, the course of the disease can be classified from indolent to more aggressive subtypes¹⁻⁵. Despite advances in the knowledge of the CLL biology, this disease remains incurable with standard therapy and prompts the need for the development of novel therapeutic agents.

Characterized by their progressive accumulation in peripheral blood, bone marrow and secondary lymphoid organs, mature CD5⁺/CD19⁺ CLL B cells rapidly undergo apoptosis when cultured *in vitro*, strongly suggesting microenvironment contribution to the proliferation and survival of the malignant lymphocytes. A current model proposes that CLL B cells, which retain their sensitivity to external signals, continuously cycle between a quiescent state in the periphery and a proliferative state in the tissue compartment⁶. Among these stimuli, antigen-driven signals are involved in the pathogenesis and progression of CLL malignancies⁷⁻¹¹ and particularly in the lymph node microenvironment^{12,13}. In on-going clinical trials, inhibiting the B Cell Receptor (BCR) signalling cascade-associated kinases provokes CLL B cell redistribution from the nodal compartment to the periphery, reinforcing the central role of the malignant B cell interactions into the tissue microenvironment¹⁴. For example, upon its binding to its receptor (BCR), antigen initiates a set of signalling cascades through activation of numerous protein tyrosine kinases, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K). The PI3K- δ isoform, which is generally restricted to hematopoietic cell types¹⁵, plays an essential role in trafficking, survival and proliferation of CLL B cells. Indeed, by preventing malignant B cells to receive survival signals delivered by the tissue microenvironments, the PI3K- δ inhibitor CAL-101 represents a promising therapeutic tool in CLL disease^{14,16,17}.

Besides their role upon BCR triggering, PI3Ks are also activated in response to the pro-survival chemokine CXCL12 that binds its cognate receptor CXCR4 of CLL B cells¹⁸. Expressed at high levels on the surface of peripheral blood CLL cells, CXCR4 signals mediate CLL cell chemotaxis and migration beneath and underneath CXCL12 secreting bone marrow stromal cells¹⁹. In contrast, CXCR4 surface expression is low in CLL B cells from lymphatic tissue¹³, probably due to a regulation by its ligand *via* receptor endocytosis^{10,20}. CXCR4 internalization involves specific phosphorylation residues located in its C-terminal sequence^{20,21}. Interestingly, analysis of a series of signalling mutants of DT40 cells shows that

BCR stimulation also results in the CXCR4 down-regulation, which is mediated by the protein kinase C (PKC)²².

Formerly known as PKC μ , protein kinase D1 (PKD) is one of the 3 members of a novel subfamily of serine kinases²³⁻²⁵. Diacylglycerol (DAG) and PKC effectors, PKD activation occurs after sequential phosphorylations (*in trans* on serine 744 and serine 748 and *in cis* on serine 916) and mediate the action of hormones, growth factors and other stimuli. In adult mice, PKD2 is selectively expressed in lymphoid cells and controls their function during adaptive immune responses²⁵. An *in situ* study in reactive lymph nodes and tumours of lymphoid tissues revealed that the level of PKD2 expression and auto-phosphorylation in neoplastic cells corresponds to the expression pattern of this kinase in their normal analogues²⁶.

We have previously shown that *in vitro* BCR engagement induced plasma membrane CXCR4 down-regulation in peripheral blood CLL B cells from some patients¹⁰. This chemokine receptor internalization was linked to decreased malignant cell mobility in response to *in vitro* CXCL12 stimulation and correlated with patients' shorter progression-free survival. However, the molecular mechanisms underlying this BCR-dependent CXCR4 down-regulation were unknown. Moreover, identification of BCR signalling intermediates might be prone to characterisation of functional biomarkers and potential therapeutic targets in CLL treatment.

In this study, we found that PKD phosphorylation/activation in response to BCR stimulation *via* PI3K δ is required for CXCR4 down-regulation in CLL B cells from the progressive patients. Collectively, our results suggested that PKD phosphorylation is a functional biomarker and its inhibition represents a promising therapeutic tool in CLL disease.

Materials and methods

CLL cell isolation and culture

CLL blood samples were obtained from untreated patients after informed consent and validation by the local research ethics committee from the Avicenne Hospital (Bobigny, France), in accordance with the Declaration of Helsinki. CLL B cells were purified by negative selection using RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies) according to the manufacturer's instructions, and purity was verified as described previously⁷. CLL B cells were cultured fresh or after viable thawing from liquid nitrogen storage in foetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories) and 10% DMSO (Sigma-Aldrich), in RPMI 1640 (PAA Laboratories) supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mmol/L L-glutamine. Upon BCR stimulation, CLL cells were cultured at 2×10^6 cells/mL in 24-well plates coated with rabbit anti-IgM antibody (10 µg/mL; Jackson Immunoresearch). Before BCR stimulation, lymphocytes were pre-incubated or not for 1 hr, with PKC inhibitors (1 µM Gö6976 (Calbiochem-Merck), 1 µM Gö6983 (Calbiochem-Merck), 1 µM GF109203X (Sigma-Aldrich), PI3K inhibitors (20 µM LY294002 (Sigma-Aldrich), 10 µM CAL101 (Selleckchem)) or PKD inhibitor (50 µM CID755673 (Tocris Bioscience). Human embryonic kidney 293 T cell line and human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line were maintained in DMEM (PAA Laboratories) supplemented with 10 % FBS.

Flow cytometry analysis

CD5, CD19 and CXCR4 membrane expression levels were analysed by flow cytometry (FACS-CANTO; Becton Dickinson) following labelling with the indicated conjugated-mouse antibodies (mAbs): PE-Cy7-anti-CD5 (clone L17F12), APC-Cy7-anti-CD19 (clone SJ25C1) and APC-anti-CXCR4 (clone 12G5) or the respective IgG isotype control mAbs (BD Biosciences). Data acquisition and analysis were performed using BD FACSDiva software. After 24 hr of BCR stimulation or treatment with 0.2 µM PMA (Cell Signaling Technology), cells viability (labelling with PO-PRO-1 Iodide; Life Technologies) and plasma membrane CXCR4 expression levels were determined in CD19⁺ and CD5⁺ CLL cells. A threshold was arbitrarily set up case-by-case on untreated cells to include at least 90 % of CXCR4 high cells on the right. BCR- and PMA-induced CXCR4 membrane expression decrease was calculated as follows:

CXCR4 decrease = $100 - ((\% \text{ CXCR4 high after IgM stimulation} \times 100) / (\% \text{ CXCR4 high before IgM stimulation}))$.

Immunoblot analysis

After 30 min of BCR stimulation or PMA treatment, total CLL B cell proteins were extracted using 1% Nonidet P-40 lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.5 mM EDTA, supplemented by proteases inhibitors (0.1 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride, 20 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/mL}$ pepstatin and 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich)). After determination of protein concentration by BCA method (Pierce), proteins were separated on SDS-PAGE gels and analyzed by western blotting with the appropriate antibodies: rabbit anti-phospho-Erk1/2 (d=1:500), rabbit anti-PKD1/2 (d=1:1,000), rabbit anti-phospho-PKD Ser^{744/748} (d=1:500), rabbit anti-phospho-PKD Ser⁹¹⁶ (d=1:1,000) (Cell Signaling Technology), rabbit anti-PKD2 (d=1:1000) (Millipore), rabbit anti-PKD3 (d=1:1000) (Bethyl Laboratories, Inc.), goat anti-CXCR4 (d=1:1,000) (Abcam), rabbit anti-phospho-CXCR4 Ser^{324/325} (d=1:1,000) (ECM Biosciences), rabbit anti-phospho-CXCR4 Ser³³⁹ (d=1:1,000) (Abcam), rabbit anti-HSP90 (d=1:1,000) (Cell Signaling Technology), monoclonal anti- α -Tubulin (1:2000) (Sigma Aldrich), Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate and Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP Conjugate (1:10,000) (Biorad). Detection was achieved using chemi-luminescence (ECL, Pierce, Rockford, IL, USA) visualized with the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

RNA isolation, reverse transcription, semi quantitative PCR and qRT-PCR.

Total RNAs were isolated from cells using Trizol reagent (Invitrogen), purified (QIAGEN) and quantified by spectrophotometry. Total RNAs (1 μg) were retro-transcribed using MMLV reverse transcriptase. The reverse transcription reactions were conducted at 22 °C for 10 min following by 42 °C for 45 min and then inactivated at 95 °C for 3 min.

Semi-quantitative PCR was conducted in a 50 μL reaction system containing the cDNAs, 20 μM of sense and anti-sense primers for target genes (Table 1) and PCR Mix (Applied Biosystems). The reactions were performed at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles at 98 °C for 30 sec, 58 °C for 30 sec, and 72 °C for 30 sec, with a final extension at 72 °C for 7 min. Then, the reaction products were electrophoresed on 2% agarose (Sigma-Aldrich) gels and visualized with Ethidium bromide staining (Sigma-Aldrich). The gels were photographed under a UV light with the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was performed using a 7500 SDS Thermal Cycler (Applied Biosystems). Complementary DNAs, 3.2 μ M gene-specific sense and anti-sense primers, as well as specific FAM-MGB probes (Applied Biosystems) (Table 1) and PCR Master Mix were included in a 25 μ L reaction system. The reactions were performed at 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 98 °C for 15 sec and 58 °C for 1 min. Each experiment was repeated in duplicates. Cyclophilin was used as internal gene control for relative quantification of each PKD gene expression using the Δ Ct method and values are expressed as $2^{-\Delta Ct}$.

Table 1: PKD primers used for semi-quantitative and real-time PCR (Applied Biosystems)

Target	Sense primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	FAM-MGB probe (5'-3')	Amplicon size
PKD1	ctgcctggtgtgcctcagtatat	aagagcactaggtcttcacagcta	aaactcaagacaatgcac	76 bp
PKD2	ctccacagcggttcttcaca	catccagttgggcaggaa	ccagcaatgaactgttc	74 bp
PKD3	gctgagttgtatgtctttgcatagc	atggtgtcagtcagaacatgcat	ccactctgctgctaaa	66 bp

Data analysis and statistics

Data analyses were performed using the GraphPad program (GraphPad Software Inc).

Results:

Evidences from the literature showed that BCR engagement allowed PKC-dependent CXCR4 internalization in DT40 B cell system²². According to these data, our *in silico* prediction analysis for kinase-specific phosphorylation sites of this chemokine receptor sequence yielded the identification of multiple phosphorylation consensus sites of the common PKCs (α , β , γ). Unexpectedly, this analysis also revealed the existence of a PKC μ (also called PKD1) phosphorylation consensus site (V/LXRXXS/T)²⁷ in the carboxyl-terminal sequence of human CXCR4 (320-VSRSSSLKIL-329)²².

PKD, but not PKC, is potentially implicated in antigenic stimulation-dependent CXCR4 down-regulation of BCR-responsive CLL B cells.

In order to evaluate the functional impact of various PKC on plasma membrane CXCR4 down-regulation upon BCR engagement in CLL B cells, we used drugs targeting the PKC family members (Gö6983, Gö6976 and GF109203X). Using flow cytometry analysis, the percentage of cell surface CXCR4 decrease in response to antigenic stimulation (see Materials and Methods) was calculated in CLL B cells treated or not with the different drugs.

As we have previously demonstrated¹⁰, sustained BCR stimulation (anti-IgM) of CLL B cells led to a differential down-regulation of cell surface CXCR4 expression between patients' samples. Accordingly, strong percentage of BCR-dependent CXCR4 decrease was quantified in BCR-responsive cells from some patients (Figures 1A and 1B, "Untreated" panels) whereas a weak or no CXCR4 decrease was determined in BCR-unresponsive cells from other patients (Figure Supplemental 1, "Untreated" panels).

Treatment with the pan-PKC Gö6983, which poorly inhibits PKD²⁸, did not change the percentage of CXCR4 decrease in response to anti-IgM stimulation (Figures 1A and Supplemental 1, "Gö6983" panels) in all CLL B cells, despite its inhibitory effect on PMA-dependent ERK1/2 phosphorylation (Figure Supplemental 2, lanes 3 vs 2). In contrast, cellular incubation with Gö6976, a known PKC inhibitor that preferentially inhibits classical PKC isoforms (α , β 1, β 2, and γ) and purified PKD, led to no CXCR4 decrease in BCR-responsive B cells (Figures 1A and 1B, "Gö6976" panels), without affecting BCR-unresponsive B cells (Figure Supplemental 1, "Gö6976" panels). Furthermore, cellular incubation with the GF109203X, which inhibits PKC δ *in vitro* and PKC β *in vivo*²⁹ did have any effect on CXCR4 decrease in all CLL B cells (Figures 1B and Supplemental 1,

“GF109203X” panels), in spite of its repressive action on PMA-mediated ERK1/2 phosphorylation (Figure Supplemental 2, lanes 4 vs 2). Quantification of the percentage of CXCR4 decrease in 7 BCR-responsive B cell samples (Figures 1A, right graph), as well as in 4 BCR-responsive B cell samples (Figures 1B, right graph) demonstrated that the Gö6976 had a strong inhibitory effect whereas both Gö6983 and GF109203X did not.

These data suggested that antigenic stimulation-dependent plasma membrane CXCR4 down-regulation does not involve the PKCs but points out the PKDs as potential intermediates/effectors of the BCR signalling cascade.

PKD 2 and 3 transcripts and proteins are expressed in CLL B cells

Paired with Gö6983 and GF109203X, Gö6976 treatment suggested that PKDs are implicated in BCR-dependent plasma membrane CXCR4 down-regulation in malignant B cells from some CLL patients. Given the crucial implication of PKDs in normal B cells²⁵ and the lack of evidence of their functional role in the pathogenicity of CLL disease²⁶, PKD1, PKD2 and PKD3 expression levels in CLL B cells were accessed by real time polymerase chain reaction (Q-PCR) and Western blot analysis.

Specific isoform primers were designed to amplify particular regions of the 3 PKD human genes. After verifying the PCR products by sequencing them (Figure Supplemental 3), the PKD1, 2 and 3 transcript levels were determined in 15 CLL B cell samples. As shown in Figure 2A, malignant B cells expressed PKD2 and PKD3 mRNA, whereas PKD1 was not detected.

To examine whether this finding translated into protein expression levels, PKD1, 2 and 3 were measured by Western blotting in whole cell lysates of CLL B cells from 6 patients and of 293T cell line that is known to express the 3 PKD isoforms³⁰. Signal comparison between blots hybridized with anti-PKD1/PKD2 antibody or anti-PKD2 antibody revealed that CLL B cells had higher PKD2 expression levels and no detectable PKD1 as compared with 293T cells (Figure 2B). Hybridization with anti-PKD3 antibody also indicated the presence of PKD3 protein in CLL B cells, although it was expressed at lower extent as compared to 293T cells (Figure 2B).

These transcriptional and translational data demonstrated that PKD2 and PKD3 are expressed in CLL B cells, whereas PKD1 was undetectable.

PKD phosphorylation levels are correlated to BCR-dependent CXCR4 down-regulation in CLL B cells.

Knowing that cell stimulation rapidly activates PKDs through a mechanism that involves their phosphorylation²⁴, we next evaluated the phosphorylation status of PKD2 and PKD3 and their activation upon BCR triggering in CLL B cells.

First, we tracked by immune-blot analysis PKD post-translational modifications with antibodies that recognize phospho-Ser^{744/748} or -Ser⁹¹⁶ in whole cell lysates of CLL B cells that were stimulated or not with immobilized anti-IgM. As shown in Figure 3A (left panels), anti-IgM stimulation enhanced Ser^{744/748} and Ser⁹¹⁶ phosphorylation levels of PKD in BCR-responsive CLL B cells. These phosphorylation patterns were also observed upon PMA treatment (Figure 3A, right panels). The differential phosphorylation inductions and PKD mobility shifts between anti-IgM- and PMA-stimulated cells suggested that both types of stimulation did not implicate the same phosphorylated residues in BCR-responsive cells. In contrast, anti-IgM stimulation did not modify PKD phosphorylation levels on both serine residues in BCR-unresponsive CLL B cells, whereas PMA treatment did it (Figure 3B). So by shunting BCR early intermediate activation with PMA in BCR-unresponsive cells, these data imply “intact” PKD activation.

Second, western blot analysis of the phospho-Ser^{744/748} PKD expression levels upon immobilized anti-IgM stimulation in 9 BCR-responsive cell samples showed very heterogeneous signals (Figure 4A); phosphorylation levels that did not seem to be dependent on the duration of anti-IgM stimulation and on the PKD expression levels (Figure Supplemental 4 and Figure 4A). Interestingly, quantification of both anti-IgM-dependent PKD phospho-Ser^{744/748} fold increase (Figure 4A) and of anti-IgM-dependent percentage of CXCR4 decrease determined by flow cytometry analysis (data not shown), demonstrated a significant correlation between these two parameters in the series of CLL B cell samples (Figure 4B). Indeed, high levels of PKD phospho-Ser^{744/748} and low levels of plasma membrane CXCR4 were found in anti-IgM stimulated BCR-responsive cells, whereas no or weak PKD phospho-Ser^{744/748} rate was associated with no modification of cell surface CXCR4 levels in stimulated BCR-unresponsive cells.

Moreover, BCR-unresponsive and -responsive B cells, which showed enhanced phospho-PKD following PMA treatment (Figures 3A and 3B), also displayed strong percentage of CXCR4 decrease upon PMA stimulation (Figure 4C), further linking PKD phosphorylation status and its role in CXCR4 down-regulation.

Altogether, these data implicated phospho-PKD2/3 as BCR signalling intermediates in CXCR4 internalisation of CLL B cells.

Anti-IgM-dependent CXCR4 down-regulation is modulated by a PKD inhibitor in BCR-responsive CLL B cells.

To assess the functional involvement of PKDs in the CXCR4 down-regulation upon BCR triggering in CLL B cells, we used a potent and selective cell-active small molecule inhibitor for PKDs, called CID755673³¹.

First, optimal CID755673 concentration in CLL B cells, which allowed the maximal effect on anti-IgM-dependent percentage of CXCR4 decrease with a minimal deleterious effect on cell viability, was determined (Figure S5A and B, respectively).

As already shown (Figure 1), sustained BCR stimulation led to strong percentage of BCR-dependent CXCR4 decrease in untreated BCR-responsive cells (Figure 5A, left panel, left dot plots) and a weak or no CXCR4 decrease in untreated BCR-unresponsive cells (Figure 5A, right panel, left dot plots). In contrast, treatment with 50 μ M of CID755673 reduced the percentage of BCR-mediated CXCR4 decrease in responding cells (Figure 5A, left panel, right dot plots) without affecting it in non-responding cells (Figure 5A, right panel, right dot plots). Results from a larger series of BCR-responsive CLL B cell samples (n=7) confirmed that CID755673 strongly blocked cell surface CXCR4 down-regulation upon anti-IgM stimulation (Figure 5B), strengthening the functional implication of PKD in the modulation of the chemokine receptor expression.

To determine how the CID755673 was involved in PKD inactivation, we defined the PKD phosphorylation status in BCR-responsive CLL B cells by western blotting. Results demonstrated that the PKD inhibitor weakly affected anti-IgM dependent phospho-Ser^{744/748} PKD, whereas it strongly interfered with anti-IgM-dependent phospho-Ser⁹¹⁶ PKD (Figure 5C, lanes 3 and 4). Even if CID755673 led to decrease of both phosphorylation signals upon PMA treatment (Figure 5C, lanes 7 and 8) as previously described³¹, differential mobility shifts of PKD were observed in IgM-stimulated and PMA-treated cells, suggesting that BCR triggering and DAG analogue treatment involved phosphorylation of various PKD residues.

Altogether, these data demonstrated that anti-IgM-dependent CXCR4 decrease was mediated by phosphorylation on Ser^{744/748} and Ser⁹¹⁶ of PKD, which was then activated. This suggested that PKDs were functional BCR signalling intermediates that were involved in CXCR4 internalisation of CLL B cell samples.

PI3K δ is acting upstream of PKDs in anti-IgM-dependent CXCR4 down-regulation in BCR-responsive CLL B cells

Given that PKD activation, which is reflected by enhanced PKD phospho-Ser⁹¹⁶ upon BCR engagement³², is dependent on PI3K in mouse B cells³³, we evaluated PKD phosphorylation following engagement of receptors in BCR-responsive CLL B cells in the presence of PI3K inhibitors.

Pharmacological inhibitions of PI3Ks using LY294002 (a pan-PI3K inhibitor)³⁴ or CAL101 (also called GS-1101, potent and selective inhibitor of PI3K- δ isoform¹⁷) substantially reduced the level of PKD phosphorylation on serine residues 744/748 induced by anti-IgM stimulation in CLL B cell samples from 4 patients (Figure 6A, left and right panels). Similar behaviour of both inhibitors indicated a requirement for PI3K in the BCR-dependent PKD phospho-Ser^{744/748} and suggested that PI3K was upstream of PKDs in BCR signalling cascade.

Determination of the PI3K functional impact on BCR-mediated CXCR4 down-regulation in CLL B cells revealed that both LY294002 and CAL101 inhibited percentage of CXCR4 decrease, as shown by the dot plots (Figure 6B) and by quantification in multiple CLL B treated with LY294002 (n=10, Figure 6C, left graph) or with CAL101 (n=7, Figure 6C, right panel).

Collectively, these data revealed that BCR triggering allowed PKD phosphorylation through activated PI3Ks to down-regulate cell surface CXCR4 in BCR-responsive B cells from CLL patients.

PKD activity is required for CXCR4 phosphorylation in CLL B cells

We previously established that antigenic stimulation regulates CXCR4 cell surface expression by allowing its endocytosis¹⁰. Given that CXCR4 is phosphorylated and internalized upon CXCL12 activation³⁵ and that CXCR4 sequence contains a potential PKD phosphorylation consensus site, we hypothesized that BCR-dependent PKD activation led to CXCR4 phosphorylation.

To test this hypothesis, endogenous total, phospho-Ser^{324/325} and -Ser^{338/339} CXCR4 expression levels were determined in BCR-responsive B cell samples by Western blotting analysis. Results showed that anti-IgM stimulation induced a striking increase of the CXCR4 phospho-Ser^{324/325} signal, without modifying the total and phospho-Ser^{338/339} levels of the

CXCR4. As expected (Figure 3), BCR stimulation also resulted in enhanced PKD phospho-Ser^{744/748} signal (Figure 7A).

Interestingly, PKD inhibition with the CID755673 partially blocked CXCR4 phosphorylation on Ser324/325 (Figure 7B). In accordance with our *in silico* analysis for kinase-specific phosphorylation sites (see above), this suggested that the serine 325 was a PKD target upon BCR engagement.

Taken together, these data demonstrated that BCR engagement induced PKD-dependent CXCR4 phosphorylation that might be linked to its down-regulation in CLL B cells from progressive patients.

Discussion:

We previously have showed that *in vitro* BCR engagement led to a decrease of plasma membrane CXCR4 expression in CLL B cells from patients with unfavourable prognostic factors and at risk of disease progression only¹⁰. In the current study, we have deciphered the functional mechanisms underlying this effect and provided evidences for a role of the serine kinase PKDs in BCR-induced CXCR4 down-regulation in CLL B cells.

PKD constitutes a novel family of serine/threonine kinases that comprises three isoforms PKD1/PKC μ , PKD2 and PKD3/PKC η . It was previously reported that PKD2 is the major PKD isoform expressed in murine B cell²⁵. However, little is known about the expression pattern of the three PKD isoforms in CLL B cells. In order to address this point, our analyses demonstrated that PKD2 and PKD3 were expressed both at the transcriptional and protein levels, whereas PKD1 was not detected, in all CLL samples. Our data are in line with a previous study that shows PKD2, but not PKD1, expression in human lymphocytes located in reactive lymph nodes and tumour tissues from patients with non-Hodgkin's lymphomas including CLL²⁶. Despite high sequence homologies in their catalytic domain, PKD2 and PKD3 display some differences in their amino- and carboxyl-terminal regions, which may confer isoform-specific functions²³. In this context, PKD3 does not contain the serine residue 916 in its carboxyl-terminal sequence, whereas PKD2 and PKD1 do. This serine residue is described as an important auto-phosphorylation site and is considered to reflect PKD activation. Given that PKD2 and PKD3 are the major isoforms expressed in CLL B cells and that PKD3 lacks the serine 916, the enhanced phospho-Ser⁹¹⁶ of PKDs upon anti-IgM stimulation (Figure 3) might be attributed to the activated PKD2. This suggests that PKD2 activation plays an important role in BCR-dependent CXCR4 down-regulation in CLL B cells. Besides the detected constitutive phosphorylated Ser⁹¹⁶ of PKD in basal condition, that argues for a chronic exposure of the BCR to various soluble auto-antigens⁸, the enhanced stimulation-dependent phosphorylation is in favour of a balanced expression of early BCR intermediates that establish a threshold for a cellular response¹¹.

The functional implication of PKD2/3 in BCR-induced CXCR4 down-regulation was first revealed with the combination of two inhibitors, which have different PKC/PKD inhibitory specificities. Indeed, the Gö6983 has been described to inhibit the activity of classical, novel and atypical PKCs whereas the Gö6976 acts against the classical PKCs and

PKDs only³⁶. To further confirm the PKD2/3 involvement in BCR-induced CXCR4 decrease, a selective PKD inhibitor, the CID755673³¹, was used. Given that the PKD phospho-Ser⁹¹⁶ is a signature of PKD activation³², decreased PKD2 phospho-Ser⁹¹⁶ levels upon CID755673-treatment of CLL B cells strongly suggested a reduction of the PKD2 activation. Interestingly, CID755673-treatment weakly or did not affect the enhanced BCR-dependent PKD phospho-Ser^{744/748}. This result corroborates the current model proposing that phosphorylation of both serine residues is mediated by upstream signalling effectors²³. Of note, the lack of CID755673 effect argues for absence of off-target adverse drug effect or cellular toxicity. Moreover, CID755673-treatment of CLL B cells reduced BCR-induced phospho-Ser^{324/325} CXCR4, a PKD1 phosphorylation consensus site in the carboxyl-terminal sequence of human CXCR4 that we determined with an *in silico* analysis. Finally, CID755673-treatment of CLL B-responsive cells, but non –unresponsive cells, blocked BCR-dependent CXCR4 down-regulation, suggesting implication of the phospho-Ser^{324/325} CXCR4 in its internalisation^{21,35}. To our knowledge, the data presented in this work indicate for the first time that PKD2/3 are intermediates of the BCR signalling pathways implicated in the cell surface CXCR4 internalization in the CLL B cells. Moreover, they suggest that BCR-induced CXCR4 decrease takes place according to a model of sequential PKD phosphorylation (first the Ser^{744/748} and second the Ser⁹¹⁶ auto-phosphorylation) that confers full and sustained activation of the enzyme³².

In the frame of studying the BCR downstream intermediates responsible for the PKD-dependent CXCR4 down-regulation, we identified the PI3Ks as upstream activators of PKD in response to BCR engagement. Interestingly, both BCR-induced PKD Ser^{744/748} phosphorylation and BCR-induced CXCR4 down-regulation inhibitions were observed with the CAL-101, a highly selective inhibitor of the PI3K δ isoform¹⁷. In the context of CLL disease, PI3K δ and its inhibitor CAL-101 draw much attention since *i*) PI3K δ is abundantly expressed and constitutively activated in CLL cells³⁷ and *ii*) the orally bioavailable form of CAL-101 (GS-1101, Idelalisib) has shown considerable efficiency in treatment of CLL patients with relapse or refractory disease¹⁹. Idelalisib reduces lymphadenopathy and is associated with a transient increase of lymphocytosis, thus reflecting a modulation of CLL B cells interactions with the lymph node microenvironment. Based on our previous data¹⁰, we hypothesized that BCR signalling capacity may favour the maintenance of CLL B cells within lymph nodes by dramatically reducing their mobility through CXCR4 down-regulation in

progressive CLL cases only. Thus, it is tempting to speculate that the clinical efficacy of specific inhibitors of PI3K δ in CLL relies on their capacity to abrogate the PI3K-dependent down-regulation of CXCR4 in response to BCR engagement, thus allowing restoring the ability of CLL cells to exit from lymph nodes. Following the same rationale and based on the functional implication of the PKDs in BCR-dependent CXCR4 internalisation demonstrated in this study, it should be interesting to test whether the CID755673, or other specific inhibitors, display some clinical activity in CLL disease.

We previously demonstrated that the capacity of CLL cells to respond to an *in vitro* BCR ligation is correlated to progressive CLL disease^{7,10,11}. Indeed, the heterogeneous responsiveness of CLL B cells to BCR engagement allowed to distinguish two groups of patients: the “responder” group that includes patients with unfavourable prognostic markers and shorter overall survival and, the “non-responder” group that corresponds to indolent cases exhibiting no experienced disease progression. Functionally, the responder group is characterized by CLL B cells with an elevated response upon BCR stimulation in terms of cell survival advantage^{7,10,11}, decrease of CXCR4 membrane expression¹⁰ and activation of BCR downstream effectors such as PLC γ 2 phosphorylation, Ca²⁺ release and NFAT2 transcriptional activity¹¹. Consistent with these previous findings, we observed in this study that PKD was also differentially phosphorylated in “responding” and “non-responding” CLL cells upon BCR ligation and that BCR-induced PKD phosphorylation was correlated to the CXCR4 decrease intensity. Moreover, PKD inhibitor-treatment of the BCR-responsive cells converted them into BCR-unresponsive cells. Therefore, we proposed that as for other intermediates of BCR signalling such PLC γ 2 phosphorylation¹¹, the IgM-dependent PKD phosphorylation might be a potential biomarker of the CLL disease progression.

Altogether, our new data strengthen the concept that targeting BCR-mediated pathways and its downstream intermediates may be a promising therapeutic approach in CLL.

Figure legends:

Figure 1. **Differential inhibition with the Gö6983, Gö6976 and GF109203X compounds on BCR-dependent membrane CXCR4 down-regulation proposed the implication of PKDs in BCR-responsive B cells.** *A* and *B*. BCR-responsive CLL B cells¹⁰ were incubated for 30 min in presence (anti-IgM) or in absence (unstimulated) of immobilized anti-IgM antibodies (10 μ /mL), and/or treated with the Gö6983 (1 μ M), Gö6976 (1 μ M) and GF109203X (1 μ M) compounds. After membrane labelling, CXCR4 and CD19 expressions were determined by flow cytometry and allowed the calculation of the CXCR4 decrease percentage (%) (see Material and Methods) that represents the percentage of cells down-regulating CXCR4 upon BCR ligation in presence or not of the indicated inhibitors. These percentages were graphed for Gö6983 and Gö6976 (*A*, n=7) as well as for Gö6976 and GF109203X (*B*, n=4); *P* values are indicated; *ns*, not significant.

Figure 2. **PKD2 and PKD3, but not PKD1, were detected in CLL B cells.** *A*, PKD1, 2 and 3 mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR in CLL B cells (n=15), normalized to cyclophilin and graphed. *B*, Proteins extracted from 293T cell line and CLL B cell samples were separated on SDS-PAGE, analysed by immune-blotting with anti-PKD1/PKD2 (WB: α -PKD1/2), anti-PKD2 (WB: α -PKD2) or anti-PKD3 (WB: α -PKD3) antibodies; α -tubulin expression was used as loading control.

Figure 3. **Anti-IgM stimulation mediated PKD phosphorylation in BCR-responsive B cells only.** BCR-responsive (*A*) and BCR-unresponsive CLL B cells (UPN4) (*B*) were stimulated with (+) or without (-) immobilized anti-IgM antibodies (10 μ /mL) for 30 min (left panels), or treated with PMA (200 nM) for 15 min (right panels). After protein extraction, phosphorylated (Ser^{744/748} and Ser⁹¹⁶) and total PKD expression signals were visualised by western blotting using the appropriate antibodies. Alpha-tubulin showed equal amount of proteins in each loaded well.

Figure 4. **BCR or PMA-mediated PKD phosphorylation levels correlated to cell surface CXCR4 down-regulation in CLL B cells.** *A*, CLL B cells (n=9) were stimulated with (+) or without (-) immobilized anti-IgM antibodies (10 μ /mL) for 30 min. After lysis and separation

on SDS-PAGE gel, pSer^{744/748} and total PKD expression levels were visualised by western blotting. Alpha-tubulin showed equal protein amount for each UPN. Fold increase indicated the pSer^{744/748}/α-tubulin ratio. *B*, Calculated fold increases of PKD phosphorylation (panel A) were graphed in function to BCR-dependent CXCR4 down-regulation (data not shown) in 9 CLL B samples; r^2 is the correlation coefficient. *C*, BCR-responsive or unresponsive CLL B cells were incubated for 24 h in presence (anti-IgM) or in absence (unstimulated) of immobilized anti-IgM antibodies (10 μ/mL), or treated with the PMA (200 nM, 24 h). CXCR4 and CD19 expressions were determined by flow cytometry.

Figure 5. PKD inhibition with the CID755673 blocked BCR-dependent CXCR4 down-regulation in CLL B cells. *A*, BCR-responsive (left) and BCR-unresponsive (right) CLL B cells were stimulated with (anti-IgM) or without (Unstimulated) immobilized anti-IgM antibodies (10 μ/mL) and/or treated with the CID755673 (50 μM) for 24 h. After cell surface CXCR4 and CD19 labelling and flow cytometry analysis, percentages of CXCR4 down-regulation were calculated. *B*, Percentages of cell surface CXCR4 down-regulation were calculated in 10 untreated and CID-treated CLL B samples and graphed. *C*, BCR-responsive CLL B cells were BCR-stimulated (+ anti-IgM) or PMA-treated (+ PMA) for 30 min in the presence or not of CID755673 (50 μM). Western blot analysis showed the signals of pSer^{744/748} and pSer⁹¹⁶ PKD in the different conditions; alpha-tubulin signals serving as loading controls.

Figure 6. PI3K inhibition with the Ly294002 and CAL101 blocked BCR-dependent CXCR4 down-regulation in CLL B cells. *A*, BCR-responsive CLL B cells (n=4) were BCR-stimulated (+ anti-IgM), for 30 min in the presence of either Ly294002 (left panels) or CAL101 (right panels). Signals from pSer^{744/748} and total PKD were obtained with the appropriate antibodies following western analysis; alpha-tubulin signals were used as controls. *B*, BCR-responsive CLL B cells (UPN 88) were stimulated with (anti-IgM) or without (Unstimulated) immobilized anti-IgM antibodies (10 μ/mL) and/or treated with the Ly294002 (20 μM; middle panels) or CAL101 (50 μM; right panels) for 24 h. Flow cytometry analyses were processed on CD19⁺/CXCR4⁺ cells, as showed on dot plots, and the percentage of CXCR4 down-regulation was calculated. *C*, Left graph depicted the percentages of cell surface CXCR4 down-regulation in 10 untreated and Ly294002-treated

CLL B samples, whereas the right one illustrated the 7 untreated and CAL101-treated CLL B samples.

Figure 7. Anti-IgM stimulation led to CXCR4 phosphorylation on PKD consensus site in CLL B cells. *A*, BCR-responsive CLL B cells (UPN 96) were stimulated with anti-IgM (+) or not (-) with immobilized anti-IgM antibodies (10 μ /mL) for 30 min. *A*, Western blotting analysis with anti-pSer^{324/325}, -pSer^{338/339}, -CXCR4 antibodies revealed the total and phosphorylated forms of this receptor whereas anti-pSer^{744/748} and -PKD antibodies showed the total and phosphorylated form of the kinase; anti-HSP90 antibody showed equal amount of protein in both conditions. *B*, BCR-responsive CLL B cells (UPN 88) were BCR-stimulated (+ anti-IgM) and/or treated with CID755673. Signals from anti-pSer^{324/325} or -total CXCR4 were obtained with the appropriate antibodies following western analysis; anti-IgM fold increases are indicated below and HSP90 signals were used as controls.

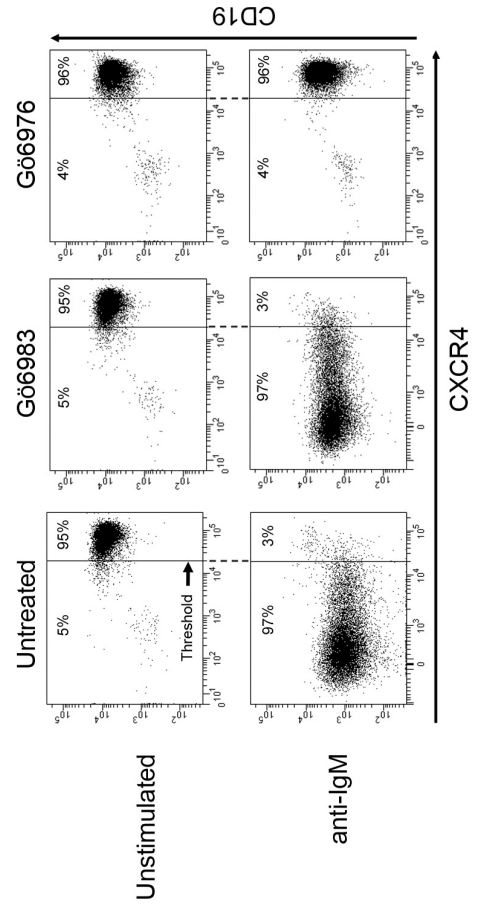
References:

- 1 Dighiero, G. *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* **78**, 1901-1914 (1991).
- 2 Caligaris-Cappio, F. & Ferrarini, M. B cells and their fate in health and disease. *Immunol Today* **17**, 206-208, doi:10.1016/0167-5699(96)30008-X (1996).
- 3 Hamblin, T. J. & Oscier, D. G. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev* **11**, 119-128, doi:10.1016/S0268-960X(97)90007-2 (1997).
- 4 Chiorazzi, N., Rai, K. R. & Ferrarini, M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804-815, doi:10.1056/NEJMra041720 (2005).
- 5 Letestu, R. *et al.* Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* **116**, 4588-4590, doi:10.1182/blood-2010-06-288274 (2010).
- 6 Hillmen, P. Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2011**, 104-109, doi:10.1182/asheducation-2011.1.104 (2011).
- 7 Deglesne, P. A. *et al.* Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer research* **66**, 7158-7166, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0085 (2006).
- 8 Efremov, D. G., Gobessi, S. & Longo, P. G. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev* **7**, 102-108, doi:10.1016/j.autrev.2007.02.021 (2007).
- 9 Pleyer, L., Egle, A., Hartmann, T. N. & Greil, R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 405-418, doi:10.1038/nrclinonc.2009.72 (2009).
- 10 Vlad, A. *et al.* Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer research* **69**, 6387-6395, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4750 (2009).
- 11 Le Roy, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356-365, doi:10.1182/blood-2011-12-397158 (2012).
- 12 Messmer, B. T. *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation* **115**, 755-764, doi:10.1172/JCI23409 (2005).
- 13 Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563-574, doi:10.1182/blood-2010-05-284984 (2011).
- 14 Burger, J. A. & Chiorazzi, N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in immunology*, doi:10.1016/j.it.2013.07.002 (2013).
- 15 Vanhaesebroeck, B. *et al.* P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4330-4335 (1997).
- 16 Kienle, D. *et al.* Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood* **107**, 2090-2093, doi:10.1182/blood-2005-04-1483 (2006).
- 17 Lannutti, B. J. *et al.* CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* **117**, 591-594, doi:10.1182/blood-2010-03-275305 (2011).

- 18 Niedermeier, M. *et al.* Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood* **113**, 5549-5557, doi:10.1182/blood-2008-06-165068 (2009).
- 19 Burger, J. A. & Gribben, J. G. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in cancer biology*, doi:10.1016/j.semcancer.2013.08.011 (2013).
- 20 Signoret, N. *et al.* Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *Journal of cell science* **111** (Pt 18), 2819-2830 (1998).
- 21 Orsini, M. J., Parent, J. L., Mundell, S. J., Marchese, A. & Benovic, J. L. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31076-31086 (1999).
- 22 Guinamard, R. *et al.* B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *The Journal of experimental medicine* **189**, 1461-1466 (1999).
- 23 Rozengurt, E., Rey, O. & Waldron, R. T. Protein kinase D signaling. *The Journal of biological chemistry* **280**, 13205-13208, doi:10.1074/jbc.R500002200 (2005).
- 24 Fu, Y. & Rubin, C. S. Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO reports* **12**, 785-796, doi:10.1038/embor.2011.139 (2011).
- 25 Matthews, S. A. *et al.* Unique functions for protein kinase D1 and protein kinase D2 in mammalian cells. *The Biochemical journal* **432**, 153-163, doi:10.1042/BJ20101188 (2010).
- 26 Kovalevska, L. M. *et al.* Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas. *Experimental oncology* **28**, 225-230 (2006).
- 27 Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F. J., Songyang, Z. & Cantley, L. C. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *The Journal of biological chemistry* **272**, 952-960 (1997).
- 28 Martiny-Baron, G. *et al.* Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *The Journal of biological chemistry* **268**, 9194-9197 (1993).
- 29 Mackay, H. J. & Twelves, C. J. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature reviews. Cancer* **7**, 554-562, doi:10.1038/nrc2168 (2007).
- 30 Azoitei, N. *et al.* Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut* **59**, 1316-1330, doi:10.1136/gut.2009.206813 (2010).
- 31 Sharlow, E. R. *et al.* Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinolone. *The Journal of biological chemistry* **283**, 33516-33526, doi:10.1074/jbc.M805358200 (2008).
- 32 Matthews, S. A., Rozengurt, E. & Cantrell, D. Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *The Journal of biological chemistry* **274**, 26543-26549 (1999).
- 33 Vigorito, E., Kovessi, D. & Turner, M. Synergistic activation of PKD by the B cell antigen receptor and CD19 requires PI3K, Vav1 and PLCgamma. *Cellular signalling* **18**, 1455-1460, doi:10.1016/j.cellsig.2005.11.008 (2006).
- 34 Gharbi, S. I. *et al.* Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical journal* **404**, 15-21, doi:10.1042/BJ20061489 (2007).

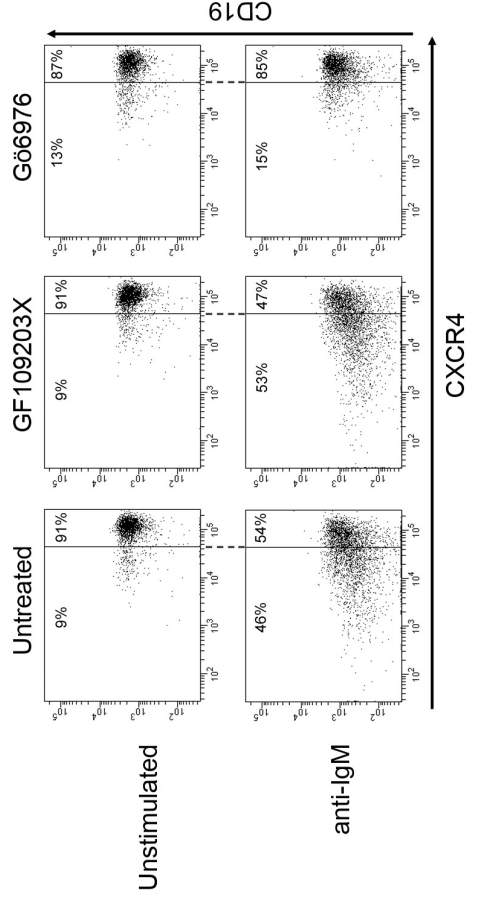
- 35 Haribabu, B. *et al.* Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry* **272**, 28726-28731 (1997).
- 36 Gschwendt, M. *et al.* Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS letters* **392**, 77-80 (1996).
- 37 Herman, S. E. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* **116**, 2078-2088, doi:10.1182/blood-2010-02-271171 (2010).

A



CXCR4 decrease: 96% 96% 0%

B



CXCR4 decrease: 41% 48% 2%

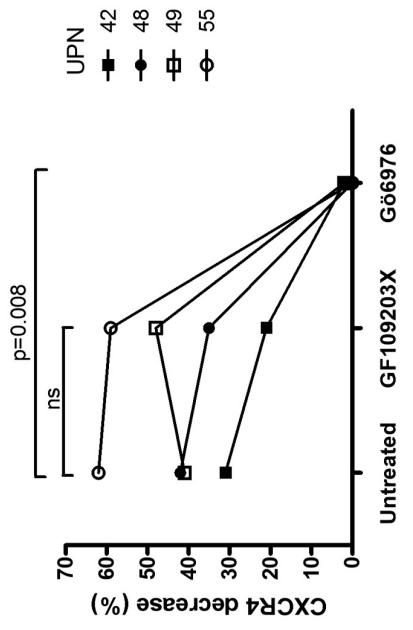
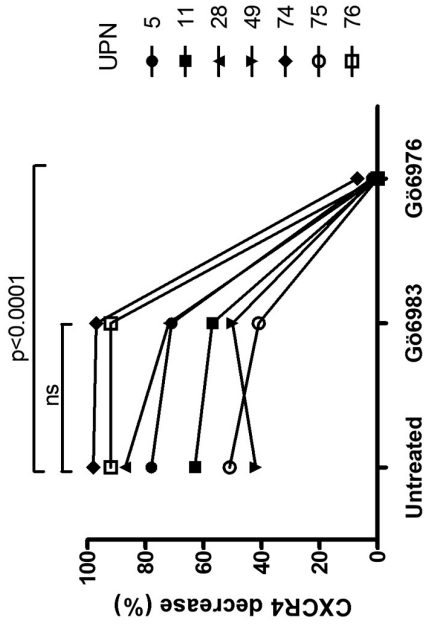
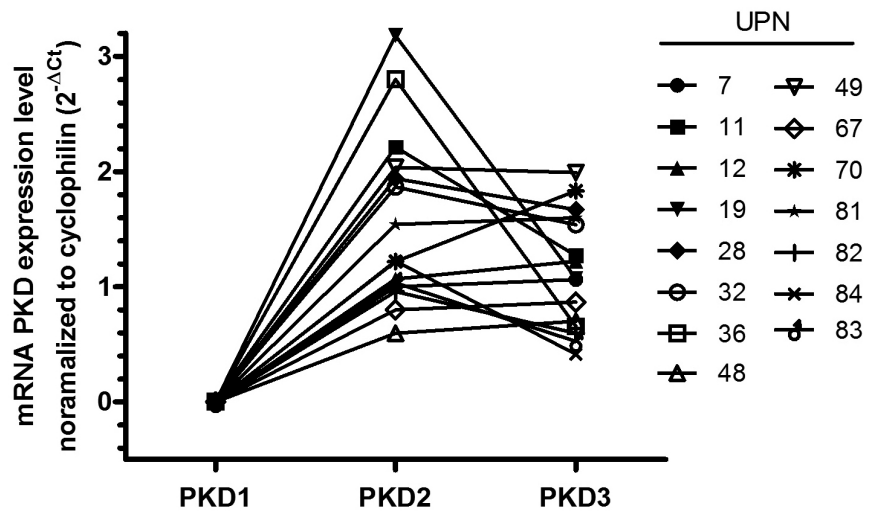


Figure 1

A



B

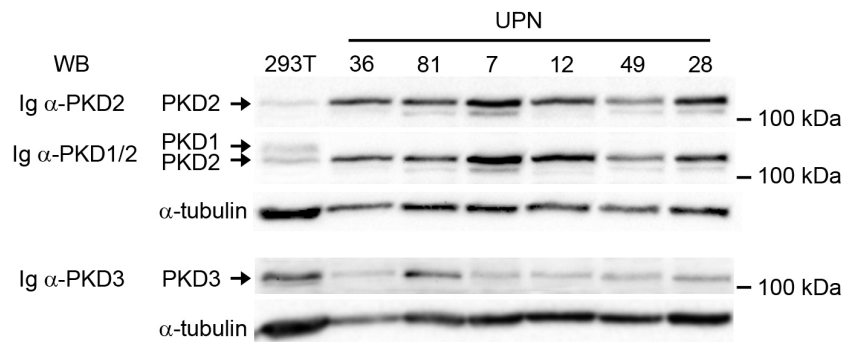


Figure 2

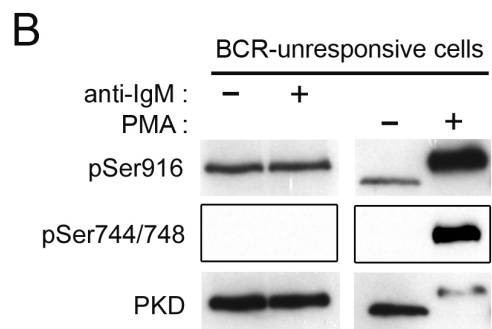
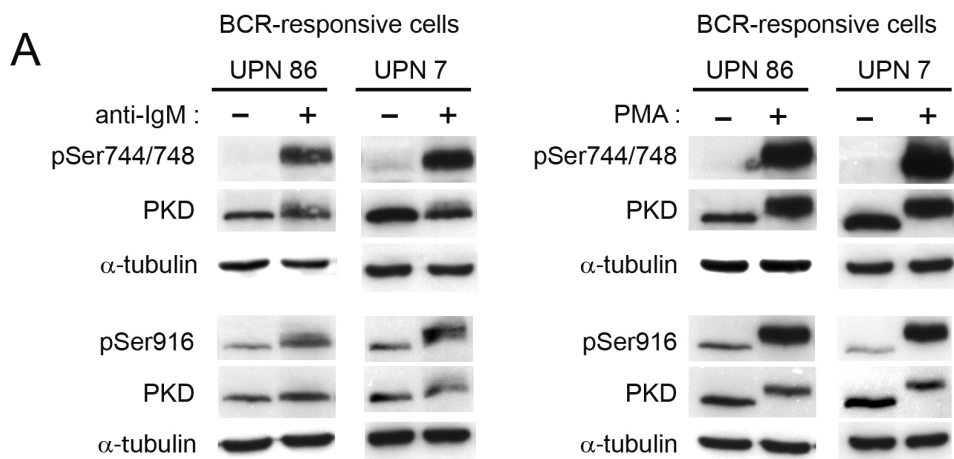


Figure 3

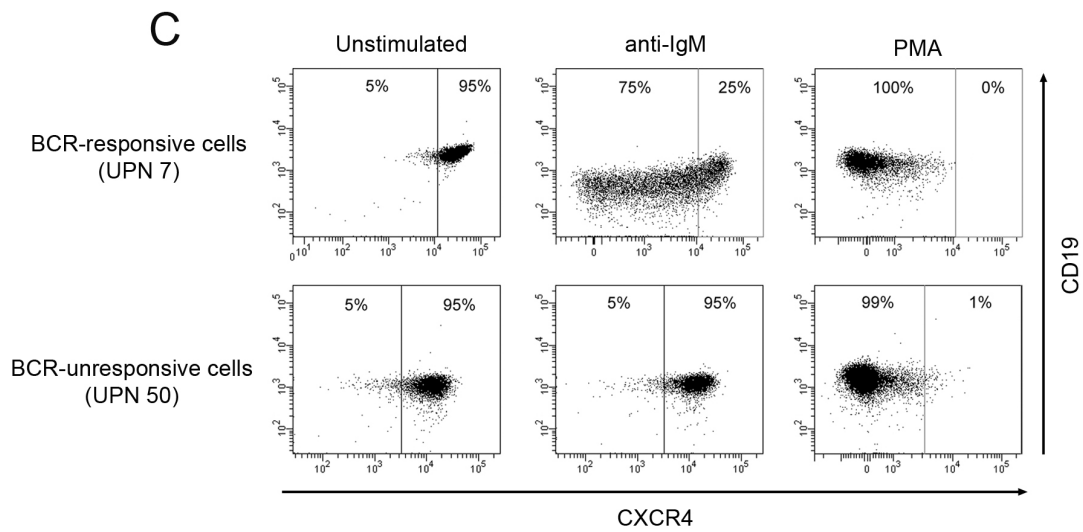
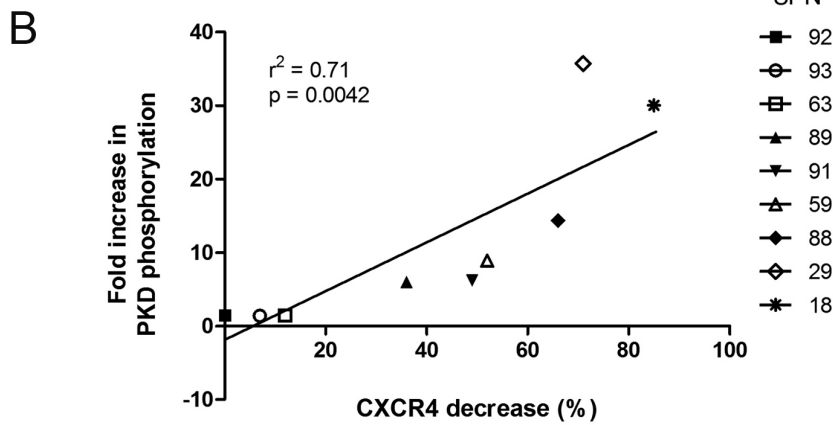
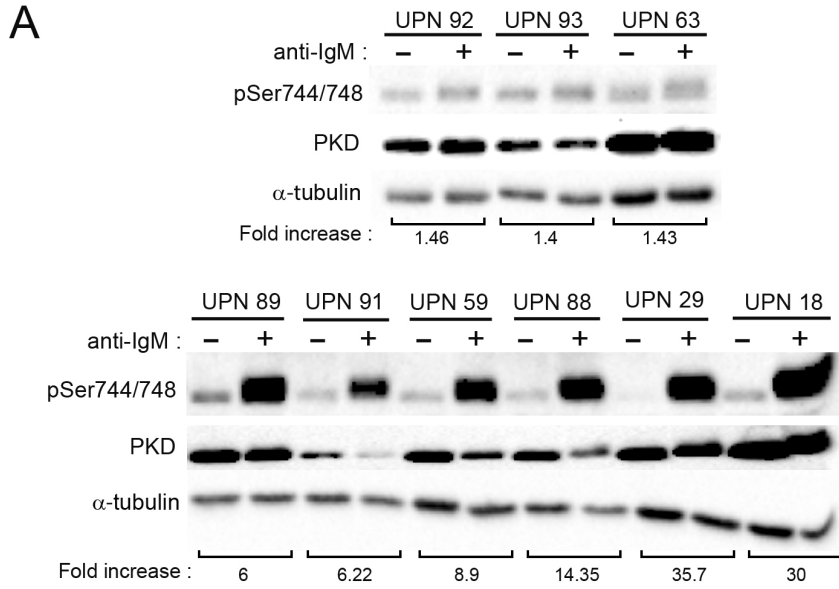


Figure 4

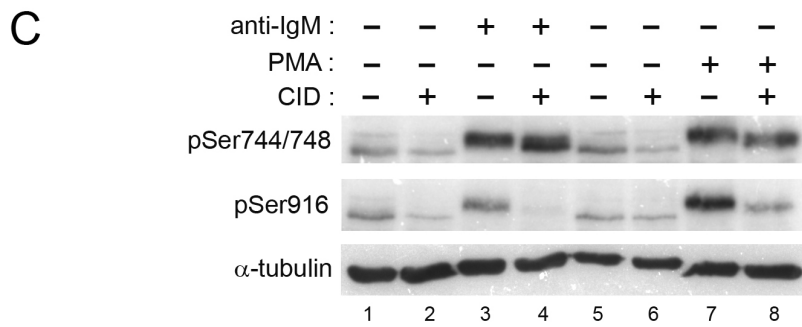
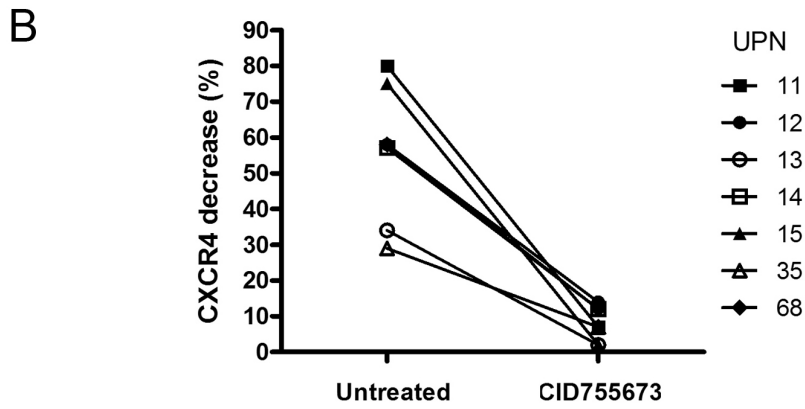
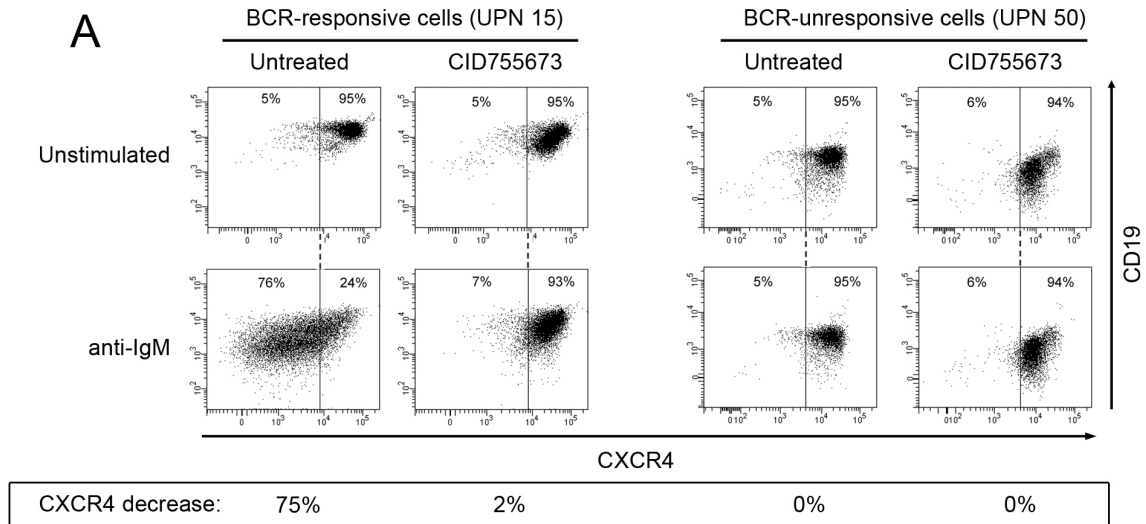


Figure 5

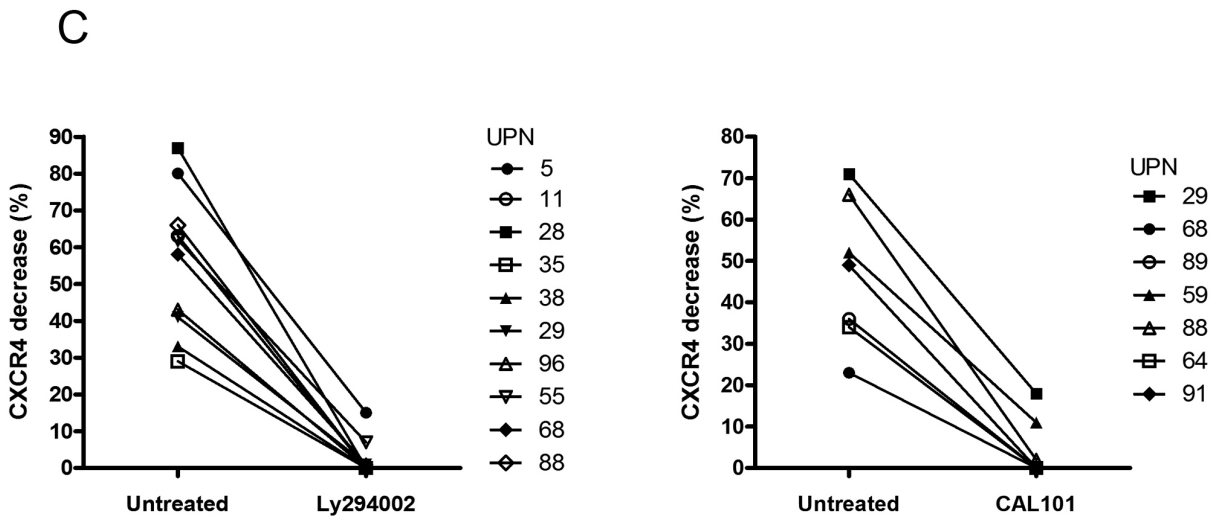
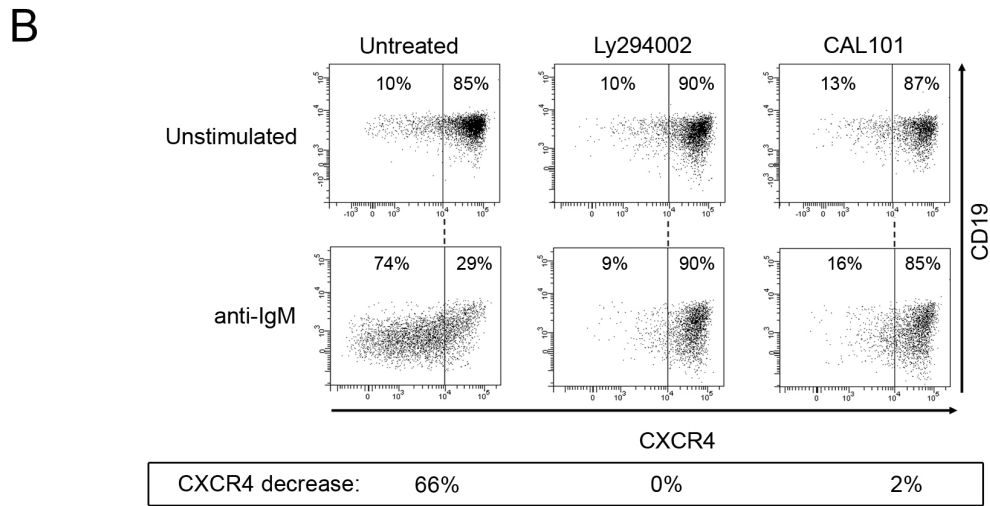
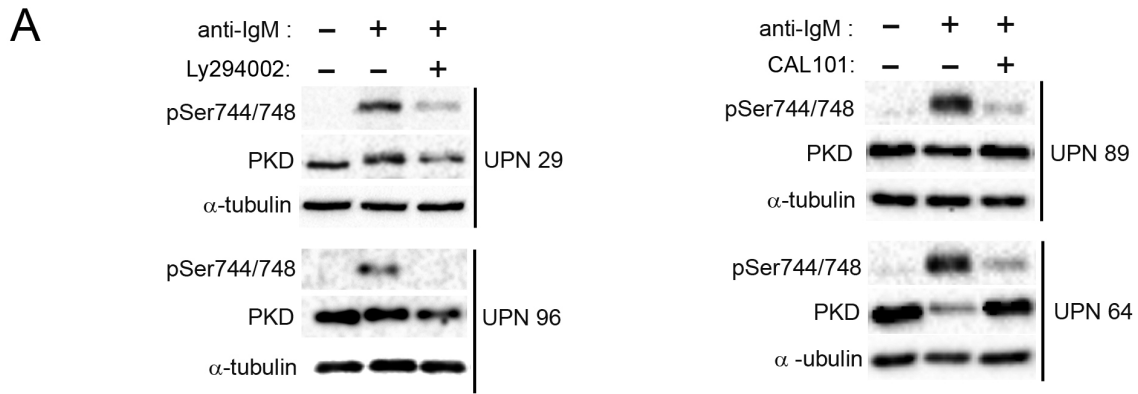


Figure 6

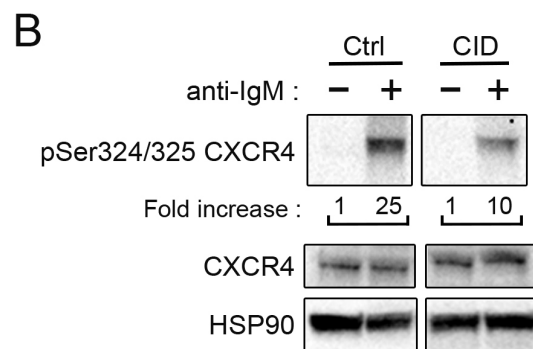
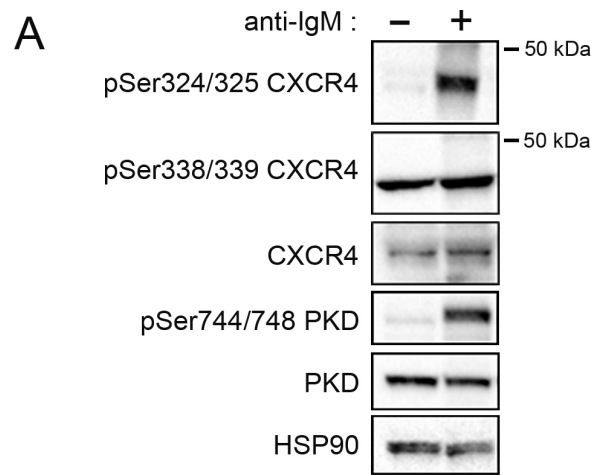


Figure 7

Supplemental Figure S1

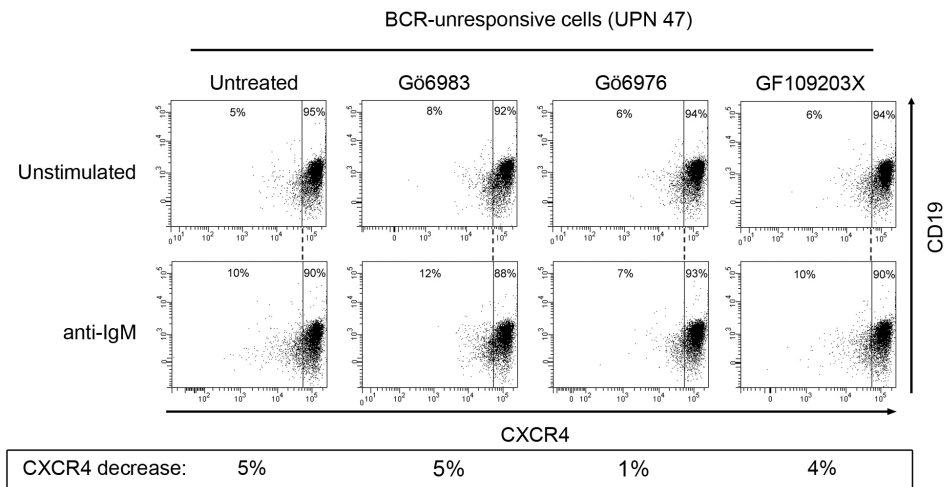


Figure Supplemental 1. **Anti-IgM stimulation or Gö6983, Gö6976 and GF109203X inhibitors had no effect on membrane CXCR4 expression in BCR-unresponsive cells.** Representative dot plots showed cell surface CXCR4 and CD19 expressions in BCR-unresponsive cell sample (UPN 47) that were stimulated (anti-IgM) or not (unstimulated) and treated (Gö6983, Gö6976 and GF109203X) or not (untreated) with various PKC/PKD inhibitors. As described in Material and Methods section, the calculated percentage of CXCR4 decrease are indicated below.

Supplemental Figure S2

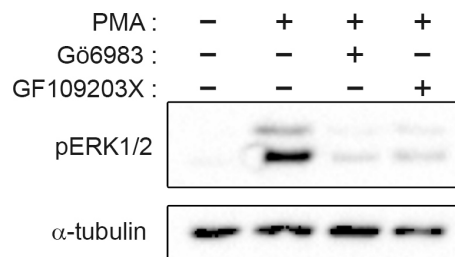


Figure Supplemental 2. **PMA-dependent ERK1/2 phosphorylation was strongly decreased in presence of Gö6983 and GF109203X inhibitors.** CLL cells were stimulated (+) or not (-) with PMA and/or treated (+) or not (-) with Gö6983 or and GF109203X. The pERK1/2 expression levels were determined by western blot using appropriate antibody; α -tubulin was used as loading control.

Supplemental Figure S3

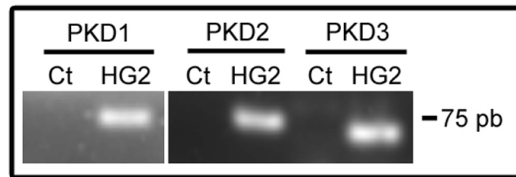


Figure Supplemental 3. **Specific amplification of the 3 PKD isoforms.** Designed primers targeting human PKD1, PKD2 and PKD3 were used to amplify the 3 PKD isoforms in HepG2 cell line (HG2); Ct meaning PCR conditions without cDNA. PCR products (around 75 base pairs) were visualised on agarose gel, cloned and sequenced (see Material and Methods).

Supplemental Figure S4

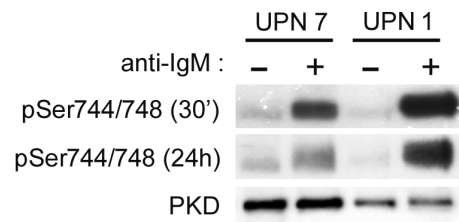


Figure Supplemental 4. **Short and sustained BCR stimulation led to PKD phosphorylation on Ser744/748 sites.** BCR-responsive CLL B cells were subjected to acute or sustained anti-IgM stimulations (30 min and 24 h, respectively). Protein extracts were separated on SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and hybridized with anti-pSer^{744/748} or -total PKD antibodies.

Supplemental Figure S5

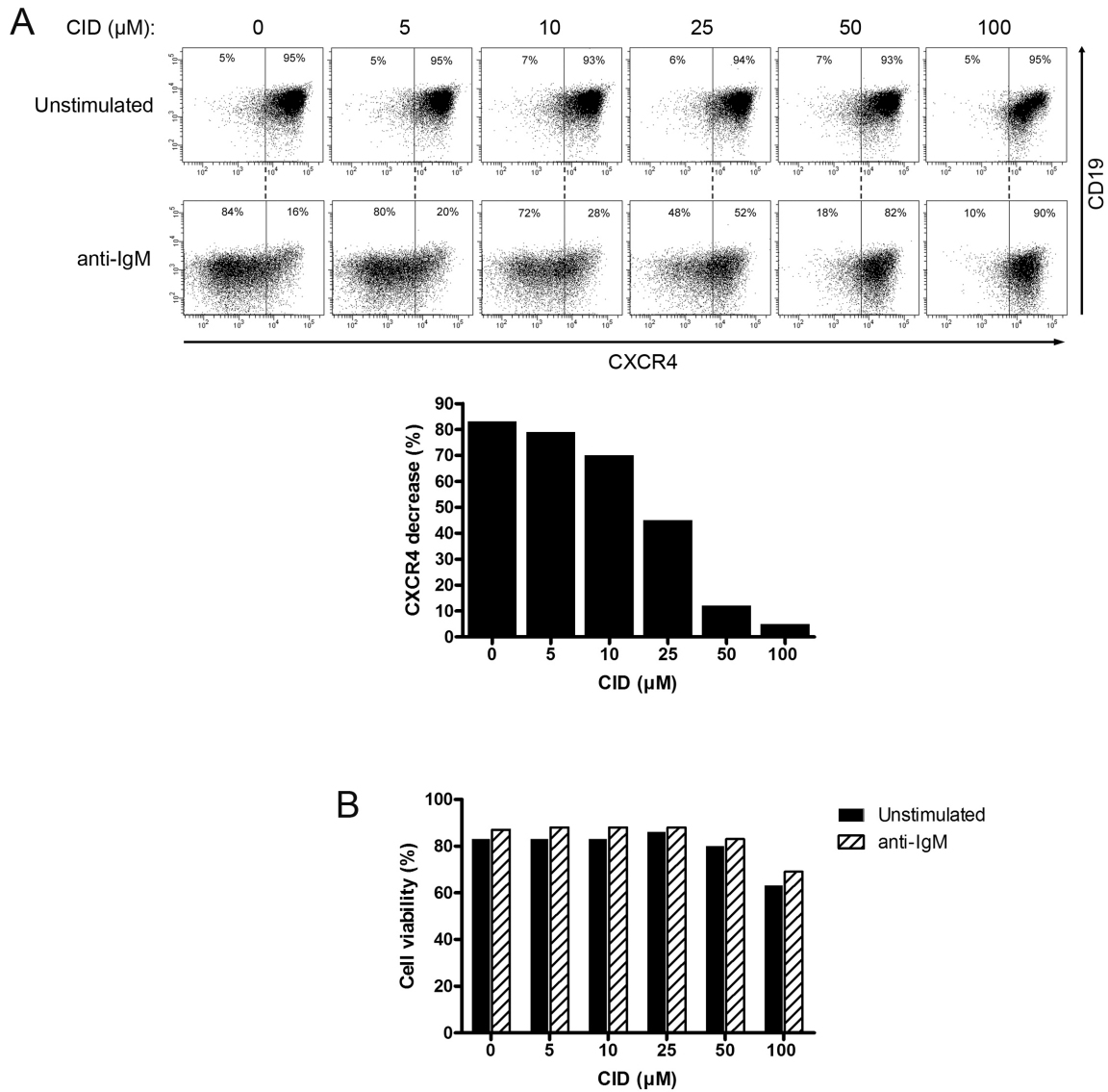


Figure Supplemental 5. **Determination of the CID755673 concentration in CLL B cells.** CLL B cells were treated with various CID755673 concentrations (from 0 to 100 μM) and stimulated (anti-IgM) or not (Unstimulated) for 24 hr. **A** showed dot plots of cell surface CXCR4 and CD19 expressions after flow cytometry analysis. The percentages of BCR-dependent CXCR4 down-regulation were calculated and graphed. **B**, After labelling cells with PO-PRO-1 Iodide and analysis by flow cytometry, the graph displayed the percentages of cell viability. **A** and **B** allowed to choose 50 μM CID755673 for our study.

VIII.2.4. Résultats complémentaires

La stimulation du BCR induit une downrégulation de l'expression membranaire du CXCR5

Le récepteur CXCR5 et son ligand CXCL13 jouent un rôle majeur dans la régulation du trafic intra-ganglionnaire des LB, en favorisant leur migration vers et au sein des zones folliculaires (Chap. III.2.3). Dans le but d'approfondir le rôle de la stimulation antigénique sur le trafic intra-ganglionnaire des LB-LLC, nous avons regardé l'effet de la stimulation *in vitro* du BCR sur l'expression membranaire du CXCR5. Les résultats présentés dans la figure 1 montre que la stimulation soutenue (24h) du BCR des LB-LLC par un anti-IgM immobilisé entraîne une downrégulation de l'expression membranaire du récepteur CXCR5. Cet effet peut être quantifié en terme de « réponse » CXCR5 (voir légende Fig. 51) et équivaut à 83% dans le cas présenté dans cette figure.

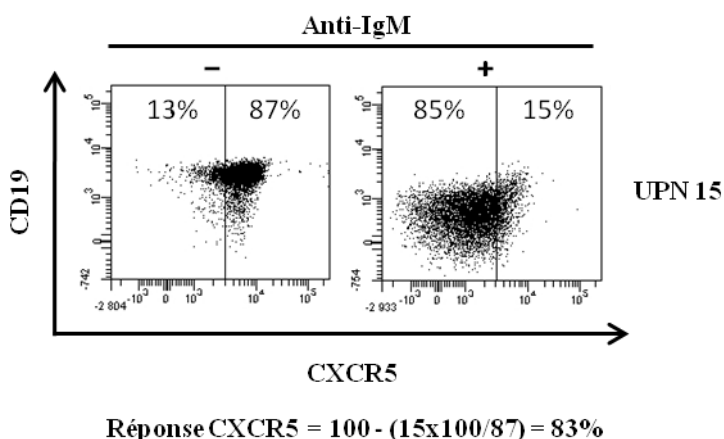


Figure 51 : Downrégulation du récepteur CXCR5 en réponse à la stimulation antigénique. Les LB-LLC ont été stimulés ou non par un anti-IgM immobilisé (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Jackson Immunoresearch) pendant 24h. L'expression membranaire du CXCR5 a ensuite été analysée par cytométrie en flux, après un marquage des cellules avec un anticorps anti-CXCR5 (Monoclonal anti-human CXCR5-PerCP, R&D Systems). Un seuil arbitraire permet de définir un pourcentage de LB CXCR5 high à droite du seuil. Le pourcentage de réponse CXCR5 correspondant au pourcentage de LB CXCR5 high qui downrégulent le récepteur en réponse à la stimulation antigénique, a été calculé comme suit : Réponse CXCR5 = $100 - ((\% \text{ CXCR5 high après stimulation} \times 100) / (\% \text{ CXCR5 high avant stimulation}))$.

Les réponses CXCR4 et CXCR5 sont concomitantes, variables et corrélées

Sur la base des résultats présentés ci-dessus, nous avons cherché dans un deuxième temps à déterminer s'il existait une corrélation entre la down-régulation du CXCR4 et celle du CXCR5 en réponse à la stimulation soutenue du BCR. Comme montré dans la figure 52A, la stimulation antigénique entraîne une diminution concomitante du CXCR4 et du CXCR5 puisque la majorité des cellules présentent la capacité de down-réguler à la fois le CXCR4 et le CXCR5. La réponse CXCR4/CXCR5 a ensuite été analysée dans une série de 20 patients LLC. Les figures 52B et 52C montrent de manière intéressante

que les capacités de réponse des cellules de LLC en termes de down-régulation du CXCR4 et du CXCR5 sont fortement corrélées.

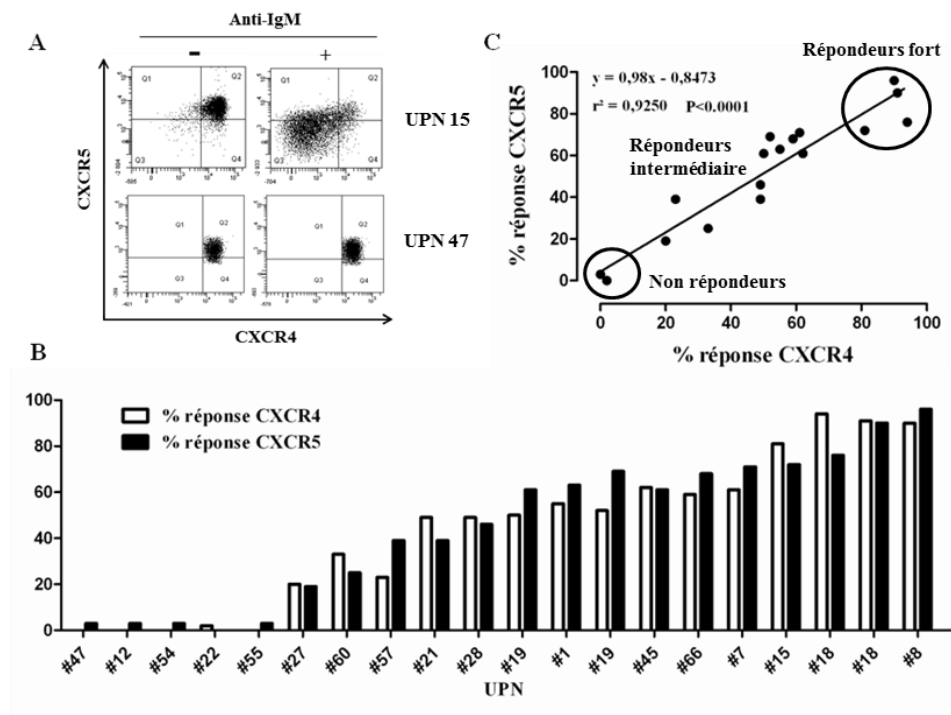


Figure 52 : Corrélation entre la réponse CXCR4 et la réponse CXCR5 induites par la stimulation antigénique. Les LB-LLC ont été stimulés ou non par un anti-IgM immobilisé pendant 24h. L'expression membranaire des récepteurs CXCR4 et CXCR5 a été analysée par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-CXCR4 (monoclonal anti-CXCR4-APC, BD Biosciences) et un anticorps CXCR5 (Fig. 51). Le pourcentage de réponse CXCR4 et CXCR5 a été calculé comme indiqué dans la figure 1. (A) Profil représentatif (UPN15) de la réponse concomitante CXCR4/CXCR5. (B) Représentation de la variabilité d'intensité de réponse CXCR4 et CXCR5 au sein d'une série de 20 patients de LLC non traités. (C) Diagramme de corrélation entre les réponses CXCR4 et CXCR5.

Comme dans le cas du CXCR4, nous avons observé deux groupes de réponse cellulaire : un groupe "**répondeur au BCR**" constitué de cellules B qui diminuent l'expression du CXCR5 membranaire en réponse à la stimulation du BCR (**Fig. A, UPN15**) et un groupe "**non répondeur au BCR**" constitué de lymphocytes B qui ne répondent pas à cette stimulation en termes de diminution du CXCR5 en surface (**Fig. A, UPN47**). De plus, les cellules du groupe "répondeur" présentent une diminution concomitante du CXCR4 et du CXCR5. Une étude sur une cohorte de 14 patients confirme ce résultat et montre une très forte corrélation entre les diminutions du CXCR4 et du CXCR5 en réponse à la stimulation du BCR (**Fig. 52C**).

Les downrégulations concomitantes du CXCR4 et du CXCR5 semblent mettre en jeux les mêmes voies de signalisation en aval du BCR

La forte corrélation observée entre l'intensité de réponse du CXCR4 et celle du CXCR5 suggère fortement que ces phénomènes mettent en jeu des mécanismes d'activation communs. Nous avons précédemment montré que la down-régulation du CXCR4 en réponse au BCR était dépendante de la PI3K et des PKD2/3. Afin de vérifier l'implication de ceux deux molécules dans la réponse CXCR5, les LB-LLC ont été prétraités soit avec un inhibiteur pan-PI3K, le LY294002 (Fig. 53B), soit avec un inhibiteur pan-PKD, le CID755673 (Fig. 53A). Les résultats présentés dans les figures 53A et 53B montrent que ces inhibiteurs bloquent de manière efficace la down-régulation concomitante du CXCR4 et du CXCR5, indiquant que la réponse CXCR5 est également dépendante de la PI3K et des PKD. Ce résultat a été confirmé sur une série de 10 patients LLC (Fig. 53C) et permet de suggérer que les réponses CXCR4 et CXCR5 dépendent des mêmes voies de signalisation activées en aval du BCR.

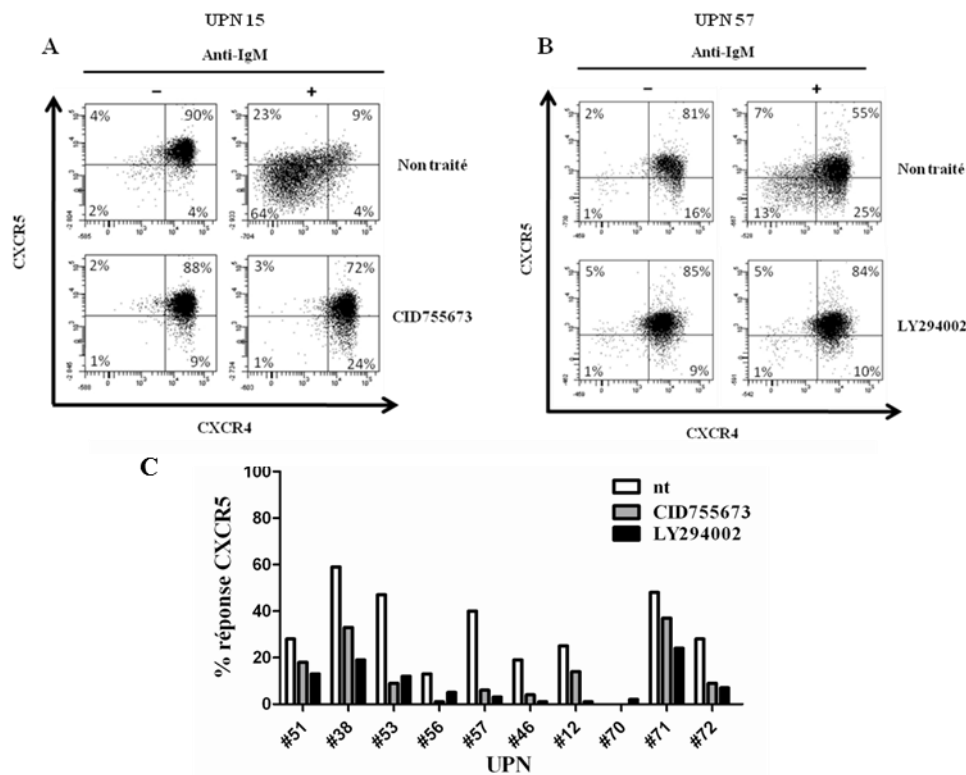


Figure 53 : Effet des inhibiteurs de PKD (CID755673) et de PI3K (LY294002) sur la réponse CXCR4 et CXCR5. Les LB-LLC ont été pré-incubés ou non pendant 1h avec un inhibiteur de PKD (50µM, CID755673, Tocris Bioscience) ou un inhibiteur de PI3K (20µM, LY294002, Sigma-Aldrich) ; puis stimulés ou non par un anti-IgM immobilisé pendant 24h. L'expression membranaire des récepteurs CXCR4 et CXCR5 a été analysée et le pourcentage de réponse CXCR4 et CXCR5 a été calculé comme indiqué dans la figure 51. (A) Profil représentatif (UPN15) de l'inhibition de la réponse concomitante CXCR4/CXCR5 par le CID755673. (B) Profil représentatif (UPN57) de l'inhibition de la réponse concomitante CXCR4/CXCR5 par le LY294002. (C) Représentation de l'inhibition de la réponse CXCR4 et CXCR5 par le CID755673 et le LY294002 sur une série de 10 patients LLC non traités.

Commentaires

En conclusion, la stimulation du BCR des LB-LLC entraîne une diminution de l'expression membranaire du CXCR5. Cette diminution du CXCR5 (réponse CXCR5) est hétérogène au sein des patients LLC (groupe « « répondeur et « non répondeur ») ce qui confirme à nouveau l'existence de capacités de signalisation différentielles des LB-LLC en réponse à la stimulation du BCR. De plus et de manière intéressante, les intensités de réponses CXCR4 et CXCR5 sont fortement corrélées et les mécanismes sous-jacents semblent impliquer des voies de signalisation communes activées en aval du BCR. Nous avons précédemment montré que le BCR pourrait perturber la sortie des LB-LLC du ganglion en down-régulant le CXCR4 et le CD62L. Ces résultats supplémentaires obtenus sur le CXCR5 renforcent l'idée selon laquelle la stimulation antigénique modulerait le trafic intra-ganglionnaire des LB-LLC et favoriserait l'accumulation d'un pool prolifératif de lymphocytes B malins dans les ganglions des patients atteints de la LLC.

VIII.3. L'AMD3100 perturbe le dialogue entre les LB de Leucémie Lymphoïde Chronique et les cellules stromales mésenchymateuses ou les Nurse Like Cells

VIII.3.1. Introduction et présentation des résultats

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré le rôle protecteur des cellules stromales du microenvironnement médullaire contre l'apoptose spontanée ou l'apoptose induite par les drogues des LB-LLC [139, 142]. Nous avons vu en introduction le rôle crucial joué par le CXCR4 dans l'attraction, la rétention et la survie des LB-LLC au sein du microenvironnement médullaire (Chap. IV.3.1).

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse qu'une perturbation du dialogue entre le CXCR4 et son ligand le CXCL12 exprimé par les cellules stromales permettrait de sensibiliser les LB-LLC aux agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de la LLC.

Nous avons donc analysé l'effet d'un antagoniste du CXCL12, l'ADM3100, sur :

- 1) la migration des LB-LLC
- 2) la survie induite par la co-culture des LB-LLC avec les cellules stromales
- 3) et la résistance à l'apoptose induite par les drogues.

Le premier objectif a fait l'objet de ma contribution à ce travail. Nous avons montré dans un modèle de chimiotactisme en « chambre de Boyden » qu'un traitement des LB-LLC par l'AMD3100 entraîne une inhibition d'environ 68% des capacités de migration des LB-LLC.

Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle *in vitro* de migration dit «de pseudoempéripolèse » (Chap. IV.3.2), suggérant que dans le microenvironnement médullaire, l'AMD3100 perturberait le trafic des LB-LLC.

Nous avons ensuite montré que l'AMD3100 restaure l'apoptose des LB-LLC en coculture avec les cellules stromales (NLC et MeSC).

Enfin, nous avons montré qu'en présence d'AMD3100, les drogues et notamment la fludarabine qui est utilisée dans le traitement de la LLC, montrent une meilleure efficacité à induire l'apoptose *in vitro*.

Ainsi, l'ADM3100 pourrait être considéré comme un bon complément à la chimiothérapie conventionnelle dans la LLC.

VIII.3.2. Article 3

AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments

Basile Stamatopoulos,¹ Nathalie Meuleman,¹ Cécile De Bruyn,¹ Karlien Pieters,¹ Philippe Mineur,² Christine Le Roy,³ Stéphane Saint-Georges,³ Nadine Varin-Blank,³ Florence Cymbalista,^{3,4} Dominique Bron,⁵ and Laurence Lagneaux¹

¹Laboratory of Clinical Cell Therapy, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium; ²Department of Hemato-Oncology, Grand Hôpital de Charleroi, Gilly, Belgium; ³UMR U978 INSERM (Adaptateurs de Signalisation en Hématologie), Université Paris Nord, PRES Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France; ⁴Department of Hematology, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; and ⁵Department of Hematology, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium

ABSTRACT

Background

Interactions with the microenvironment, such as bone marrow mesenchymal stromal cells and nurse-like cells, protect chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis. This protection is partially mediated by the chemokine SDF-1 α (CXCL12) and its receptor CXCR4 (CD184) present on the chronic lymphocytic leukemia cell surface.

Design and Methods

Here, we investigated the ability of AMD3100, a CXCR4 antagonist, to sensitize chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapy in a chronic lymphocytic leukemia/mesenchymal stromal cell based or nurse-like cell based microenvironment co-culture model.

Results

AMD3100 decreased CXCR4 expression signal (n=15, $P=0.0078$) and inhibited actin polymerization/migration in response to SDF-1 α (n=8, $P<0.01$) and pseudoemperipolesis (n=10, $P=0.0010$), suggesting that AMD3100 interferes with chronic lymphocytic leukemia cell trafficking. AMD3100 did not have a direct effect on apoptosis when chronic lymphocytic leukemia cells were cultured alone (n=10, $P=0.8812$). However, when they were cultured with SDF-1 α , mesenchymal stromal cells or nurse-like cells (protecting them from apoptosis, $P<0.001$), chronic lymphocytic leukemia cell pre-treatment with AMD3100 significantly inhibited these protective effects (n=8, $P<0.01$) and decreased the expression of the anti-apoptotic proteins MCL-1 and FLIP. Furthermore, combining AMD3100 with various drugs (fludarabine, cladribine, valproic acid, bortezomib, flavopiridol, methylprednisolone) in our mesenchymal stromal cell co-culture model enhanced drug-induced apoptosis (n=8, $P<0.05$) indicating that AMD3100 could mobilize chronic lymphocytic leukemia cells away from their protective microenvironment, making them more accessible to conventional therapies.

Conclusions

Taken together, these data demonstrate that interfering with the SDF-1 α /CXCR4 axis by using AMD3100 inhibited chronic lymphocytic leukemia cell trafficking and microenvironment-mediated protective effects. Combining AMD3100 with other drugs may, therefore, represent a promising therapeutic approach to kill chronic lymphocytic leukemia cells.

Key words: AMD3100, chronic lymphocytic leukemia, microenvironment, mesenchymal stromal cells, nurse-like cells, apoptosis.

Citation: Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Pieters K, Mineur P, Le Roy C, Saint-Georges S, Varin-Blank N, Cymbalista F, Bron D, and Lagneaux L. AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 2012;97(4):608-615. doi:10.3324/haematol.2011.052779

©2012 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Funding: this research was supported by the "Fonds Germaine Eisendrath-Dubois", the "Wallonie-Bruxelles International", the "Fonds National de la Recherche Scientifique - FNRS" (F.R.S.-F.N.R.S.), the French Ministry of Foreign and European affairs, and the Ministry of Higher Education and Research in the framework of a Hubert Curien partnership. B.S. (Postdoctoral Researcher), C.d.B. (Scientific Research Worker), and L.L. (Senior Research Associate) are members of the F.N.R.S.

Manuscript received on July 28, 2011. Revised version arrived on October 7, 2011. Manuscript accepted on November 2, 2011.

Correspondence: Basile Stamatopoulos, Université Libre de Bruxelles, Institut Jules Bordet, Laboratoire de Thérapie Cellulaire Clinique (LTCC), Boulevard de Waterloo 121, 1000 Bruxelles, Belgium. Phone: international +32.0.25413722. Fax: international +32.0.25413453. E-mail: bstamato@ulb.ac.be

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common leukemia in Western countries, is characterized by the accumulation of mature CD19, CD5, CD23 positive (CD19⁺CD5⁺CD23⁺) B cells which present a weak proliferation index compared with normal B cells¹ and a defect in apoptosis.² However, these cells rapidly undergo spontaneous apoptosis when they are cultured *in vitro*,³ suggesting that *in vivo* factors contribute to their prolonged survival, and reinforcing the importance of the microenvironment in this context.^{4,6} Indeed, microenvironments in the bone marrow, lymph nodes and other secondary lymphoid organs have been shown to inhibit spontaneous CLL cell apoptosis and enhance chemoresistance.⁵ In 1998, our group showed that bone marrow stromal cells could rescue CLL cells (but not normal B cells) from apoptosis,⁷ and in 2000, Burger *et al.* observed that nurse-like cells (NLC) derived from CD14⁺ cells of CLL patient blood could also protect CLL cells from apoptosis.⁸ These pro-survival effects are largely dependent on microenvironment/CLL cell contact but also on chemokines released in the milieu.

One such chemokine is stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α , also known as chemokine (C-X-C motif) ligand 12 - CXCL12), which is produced by mesenchymal stromal cells (MSC)⁹ and NLC.⁸ This chemokine and its receptor (chemokine (C-X-C motif) receptor 4, CXCR4), which is present on the CLL cell surface, play a crucial role in CLL cell trafficking and survival. Furthermore, Burger *et al.* demonstrated that SDF-1 α not only attracts CLL cells to the supportive microenvironment but also directly stimulates CLL cell survival.⁸ Several studies have shown that CLL cells can interact with their microenvironment through the CXCR4/SDF-1 α axis.^{9,10} CLL cells express high levels of CXCR4 surface receptors compared to normal B cells, making them more sensitive to this signal.¹⁰ For these reasons, the CXCR4/SDF-1 α axis has been considered as a potential target for new therapeutic strategies.¹¹

AMD3100 (also known as Plerixafor or Mozobil®) is a bicyclam molecule and a specific antagonist to the CXCR4 receptor, preventing the binding of SDF-1 α .¹² AMD3100 was initially studied for its capacity to inhibit HIV virus entry¹² and is currently used as a hematopoietic stem cell mobilization agent.¹³ In the present study, we hypothesized that AMD3100 could disrupt the MSC-based and NLC-based microenvironment/CLL cell crosstalk by interfering with the adhesion and homing of CLL cells *via* inhibition of the SDF-1 α /CXCR4 axis. The aim of this study was to demonstrate that AMD3100 could increase CLL cell sensitivity to different currently used drugs (such as fludarabine, cladribine, etc.) or others (valproic acid, flavopiridol, etc.) under investigation in CLL treatment and could, therefore, be considered as a potential novel adjuvant therapy.

Design and Methods

Patients, reagent and antibodies

This study was approved by the Bordet Institute Ethics Committee and was conducted using peripheral blood samples obtained with written informed consent from 20 CLL patients who presented with a typical CD19⁺CD5⁺CD23⁺ phenotype. Patients were either untreated or had received no treatment for

at least six months before the study. A summary of patients' characteristics is presented in the *Online Supplementary Table S1*. Cytoplasmic ZAP70 expression was determined by 3-color flow cytometry (CD3/ZAP70/CD19) and confirmed by quantitative real-time PCR.¹⁴ CD38 expression analysis, standard karyotype analysis and interphase FISH screening for the most common genetic aberrations and the IGHV gene mutation were performed as previously described.¹⁵ In the present patient population, the mean percentage of CD19⁺/CD5⁺ was 97.40 \pm 0.71% (range 91.25-99.97) and the normal B-cell (CD19⁺/CD5⁺) population was considered to be negligible. All reagents (source and excipient) and antibodies (epitope and reference) used in this work are detailed in the *Online Supplementary Appendix*.

Cell culture, AMD3100 treatment, MSC and NLC establishment, and phenotypic analysis

Mononuclear cells (MNC) were isolated from peripheral blood samples using density gradient centrifugation (Linfoprep, Biomedics, Spain). The bone marrow stromal layer and NLC were prepared as previously described.^{8,16} AMD3100 was added to the MNC from CLL patient suspension (2 \times 10⁶ cells/mL) 30 min before each experiment. Details of the culture conditions and phenotypic analysis of the MSC and NLC are presented in the *Online Supplementary Appendix*. "Myeloid cell leukemia sequence 1" (MCL-1) and "CASP8 and FADD-like apoptosis regulator" (CFLAR or FLIP) protein staining was performed on CD19-labeled cells, using the Fix and Perm Permeabilization kit according to the manufacturer's recommendations.

MSC layer establishment

Bone marrow samples were collected from healthy donors after obtaining written informed consent. MNC isolated from normal subjects were plated in Dulbecco's Modified Eagle Medium - low glucose (DMEM-LG) (Lonza Europe) supplemented with 15% FCS (Sigma-Aldrich) to obtain a stromal layer composed of mesenchymal stromal cells (MSC), as previously described.¹⁶

NLC generation and co-culture

The NLC generation protocol was adapted from the protocol previously published by Burger *et al.*⁸ MNC of CLL patients were suspended in 500 μ L of complete medium (as described above) to a final concentration of 2 \times 10⁷ cells/mL. After 14 days of culture, the non-adherent MNC from CLL patients were harvested by vigorously pipetting the content of the well and subsequently rinsing the plates with complete RPMI medium. Harvested cells were washed, and residual NLC were removed by a positive purification procedure using a CD14 magnetic bead system (MidiMACS, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Mean CD19 purity was thereafter over 98%. MNC from CLL patients were then suspended at a concentration of 2 \times 10⁶ cells/mL in complete medium and pre-treated or not with AMD3100 for 30 min; 200 μ L of these cell suspensions (with or without AMD3100) were then cultured in a 24-well plate alone or with the previously generated NLC. Viability and apoptosis were evaluated after 48 h.

Viability and apoptosis assays

Cell viability was determined by 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆)/propidium iodide (PI) staining after gating on lymphoid population based on forward and side scatter, as previously described.¹⁷ Apoptosis was measured with Annexin-V/7-Aminoactinomycin D (7-AAD) and PE-conjugated CD19 monoclonal (MoAb) antibodies, using the protocol described in the ApoTarget Kit (Biosource, Nivelles, Belgium).

Measure of CXCR4 expression on MNC from CLL patients

Untreated or AMD3100-treated MNC from CLL patients were incubated for 30 min with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD19 MoAb and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CXCR4 (epitope 12G5, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). CXCR4 expression on the CD19⁺ population was then evaluated by a comparison with cells incubated with an isotype control antibody.

Actin polymerization assay

Actin polymerization was tested as previously described.¹⁸ Briefly, 1.25×10^6 /mL were suspended in RPMI-1640 medium with 0.5% BSA at 37°C and incubated with 100 ng/mL SDF-1 α between 0 and 240 sec. To determine the rate of actin polymerization in MNC from CLL patients after AMD3100 treatment (30 min at 5 μ g/mL), MNC from CLL patients were relabeled with an allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD19 MoAb (Miltenyi Biotec). Pertussis toxin (200 ng/mL), which prevents G proteins from interacting with G protein-coupled receptors, was used as a control. At the indicated time points, 400 μ L of the cell suspension was added to 100 μ L of a solution containing 4×10^7 mol/L FITC-labeled phalloidin, 0.5 mg/mL 1- α -lysophosphatidylcholine (both from Sigma), and 18% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). The fixed cells were analyzed by flow cytometry, and all time points were plotted relative to the mean fluorescence of the sample before addition of the chemokine.

Migration in response to SDF-1 α

These assays were performed using 5- μ m diameter pore filters. To examine cell migration towards SDF-1 α , 100 ng/mL of SDF-1 α in RPMI was added to the lower chamber of the transmigration chamber (24-well, Corning Inc., New York, USA). Cells were pre-treated or not with AMD3100 (5 μ g/mL) for 30 min. Untreated or AMD3100-treated MNC from CLL patients (5×10^6) were added to the upper chamber and incubated for 3 h under culture conditions. The cells in the lower chamber were then collected, labeled with an APC-conjugated CD19 MoAb (Miltenyi Biotec), and 100 μ L of the cell suspension was counted with the MACSQUANT® flow cytometer, using the absolute volumetric cell counting function. The absolute number of CD19⁺ cells was then determined. Migration index was calculated as the number of cells transmigrating in the presence of the chemoattractant divided by the number of transmigrating cells in the absence of the chemoattractant.

In vitro migration of MNC from CLL patients into a stromal layer (pseudoemperipolesis)

We suspended 5×10^6 untreated or AMD3100-treated cells in 1 mL RPMI and these were then added to stromal layers that were established from normal subjects. After a 3-h incubation, non-adherent cells in suspension in the medium were removed. The stromal layer containing cells that had migrated was carefully washed twice with PBS in order to remove adherent cells. Transmigrated MNC from CLL patients were harvested using Tryple Select treatment (Gibco, Invitrogen, Merelbeke, Belgium), labeled with an APC-conjugated CD19 MoAb (Miltenyi Biotec) and 100 μ L of the cell suspension was counted with the MACSQUANT® flow cytometer, using the absolute volumetric cell counting function. The absolute number of CD19⁺ cells was then determined.

CLL/MSC-based microenvironment co-culture model and drug treatment

After a pre-treatment with AMD3100 for 30 min, MNC from CLL patients (2×10^6 /mL) were plated alone or with SDF-1 α , MSC

or NLC, and viability and apoptosis were evaluated after 48 h. To evaluate the potential of AMD3100 to sensitize MNC from CLL patients to drug-induced apoptosis and death, we performed the same experiment in a CLL/MSK co-culture model with or without various drugs at concentrations adapted from our previous study or the literature: fludarabine (3 μ M),¹⁹ cladribine (0.5 μ M),²⁰ methylprednisolone (10 μ M),²¹ valproic acid (1 mM),²² bortezomib (5 nM)²² and flavopiridol (50 nM).²² Viability and apoptosis were then evaluated after 48 h.

Statistical analysis

Wilcoxon's signed ranks test was used to analyze the statistical significance of the experimental results. All tests were two-sided. $P < 0.05$ was considered statistically significant, and all analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software. For normalized data, the P values presented in this paper were obtained from primary data (before normalization) because P cannot be calculated for data with the same rank.

Results

AMD3100 interferes with 12G5 antibody for binding membrane CXCR4

In order to interfere efficiently with the SDF-1 α /CXCR4 axis in MNC from CLL patients, we first determined the optimal dose of AMD3100 to use *in vitro*. To monitor the binding of AMD3100 to CXCR4 on the MNC from CLL patients' cell surface, cells were incubated with increasing concentrations of AMD3100 (0–10 μ g/mL), and the CXCR4 expression signal was measured by flow cytometry. As the CXCR4 antibody used and AMD3100 bind to the same epitope (12G5), this competitive effect could be used to monitor AMD3100 binding. An AMD3100 concentration of 5 μ g/mL in a suspension of 2×10^6 cells/mL decreased the percentage of CXCR4⁺ cells from $88.7 \pm 2.3\%$ to $13.5 \pm 2.8\%$ ($n=15$, $P < 0.0001$) (Figure 1A), and the mean fluorescence intensity ratio (MFIR) representing CXCR4 signal over isotypic signal was also decreased from 16.0 ± 1.7 to 6.2 ± 0.4 ($n=15$, $P < 0.0001$) (Figure 1B and C). We therefore decided to use a dose of 5 μ g/mL AMD3100 for the subsequent experiments. We also confirmed that MNC from CLL patients have a higher MFIR than normal B cells ($n=8$, $P=0.0003$), but there was no significant difference in the percentage of CD19⁺/CXCR4⁺ cells ($n=8$, $P=0.5870$).

AMD3100 reduces actin polymerization and migration of MNC from CLL patients in response to SDF-1 α and beneath a stromal layer

Knowing that SDF-1 α /CXCR4 axis plays an important role in CLL cell trafficking, we first investigated its inhibition on cytoskeletal rearrangement and particularly on actin polymerization. In response to 100 ng/mL SDF-1 α , MNC from CLL patients were cultured without any drug, with AMD3100 (30 min at 5 μ g/mL) or with pertussis toxin (3 h at 200 ng/mL). We detected a transient increase in filamentous actin levels a few seconds after the addition of the chemokine and a maximal increase after 20 sec. This increase was completely abolished with AMD3100 exposure ($n=8$, $P < 0.01$) as well as pertussis toxin treatment, which was used as a control (Figure 2A). We next evaluated the effect of AMD3100 on MNC from CLL patient chemotaxis in response to SDF-1 α ($n=8$). As shown in Figure 2B, AMD3100 strongly decreased the cell migration index in response to SDF-1 α : 2.8 ± 0.4 without AMD3100 vs. 0.9 ± 0.2 with AMD3100 ($P=0.0078$). These

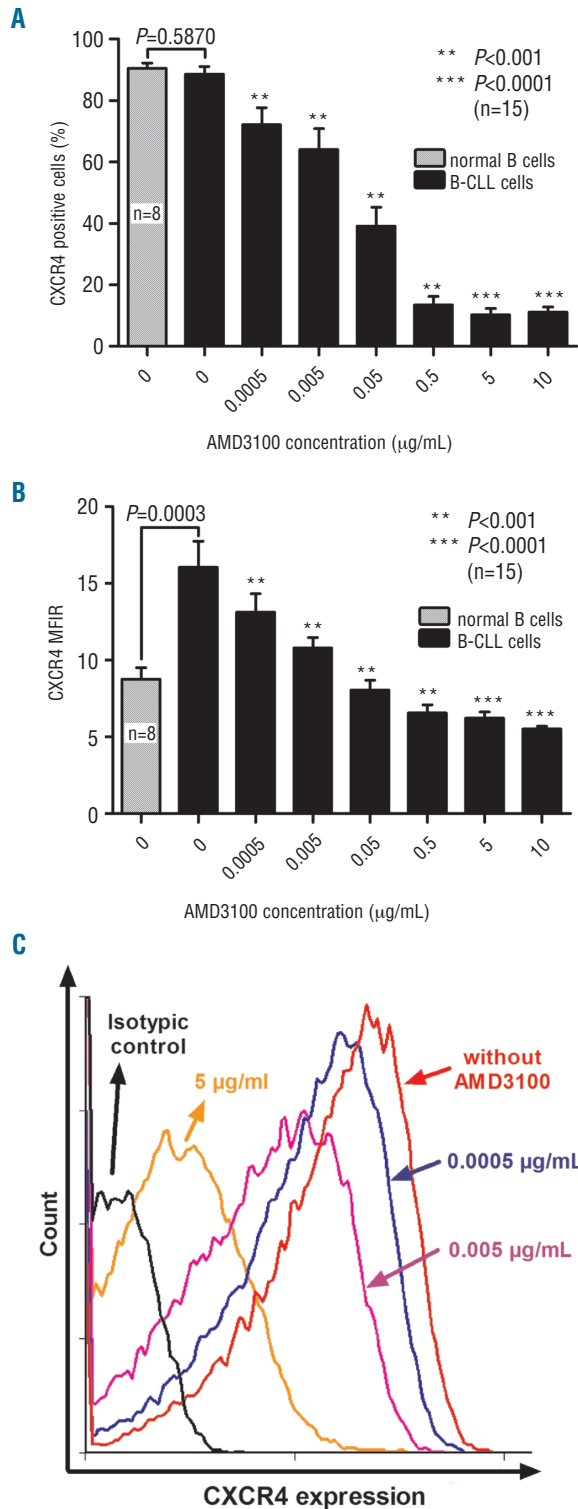


Figure 1. AMD3100 decreases CXCR4 expression signal. MNC isolated from CLL patients were incubated with AMD3100 for 30 min and then incubated with anti-CXCR4 antibody and analyzed by flow cytometry. Percentage of CXCR4⁺ cells (A) and mean fluorescence intensity ratio (MFIR representing the CXCR4 signal/isotypic signal) (B) for normal B cells (n=8) or CLL cells (n=15) treated with increasing concentrations of AMD3100. (C) Representative histogram showing the decrease in CXCR4 expression signal after AMD3100 treatment. Each bar represents the mean ± SEM of 8-15 experiments.

results correspond to an inhibition of 69.7±3.7% compared with the control cell migration. Moreover, we compared the migration of untreated or AMD3100-treated MNC from CLL patients (n=10) into a bone marrow stromal layer established from normal subjects; of the input MNC from CLL patients (5×10⁶), an average of 12.1

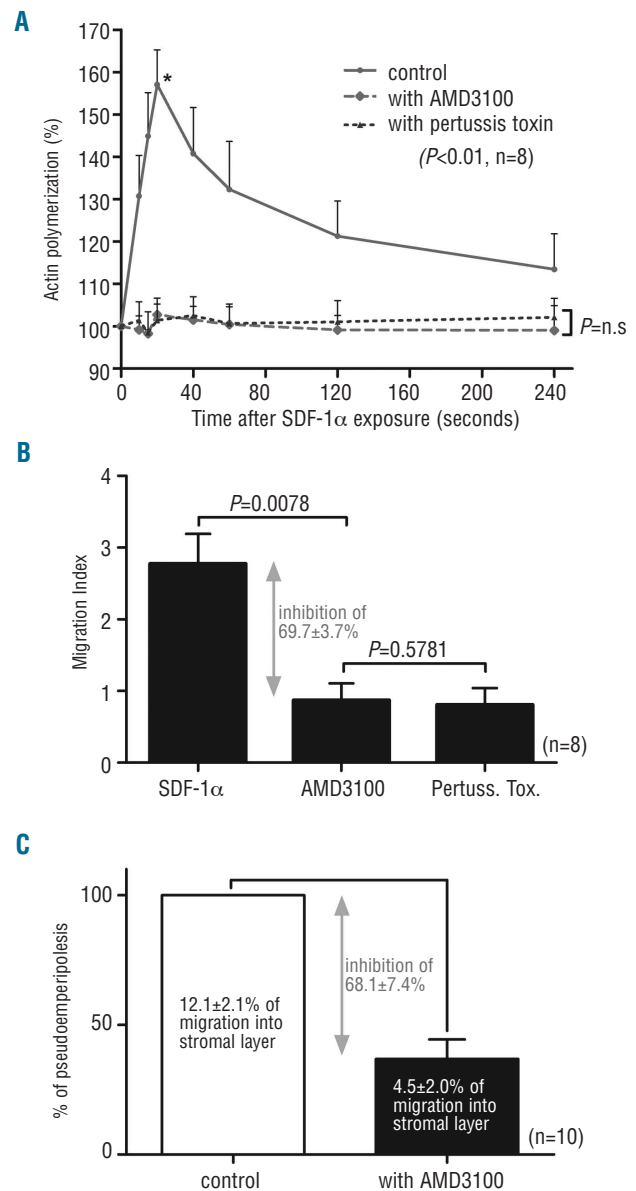


Figure 2. AMD3100 interferes with CLL cell trafficking. (A) Intracellular F-Actin was measured using FITC-labeled phalloidin in CD19-pre-labeled CLL cells after the addition of SDF-1α (100 ng/mL) at different time points without any drugs, in the presence of AMD3100 (5 µg/mL) or in the presence of pertussis toxin (200 ng/mL) as control. All time points are plotted relative to the mean fluorescence of the sample before addition of the chemokine. (B) CLL cells were pre-treated or not with AMD3100 for 30 min before being plated onto 5-µm Transwell microporous membranes for the migration assay. Results are expressed as the mean ± SEM migration index of 8 experiments. Migration index was calculated as the number of cells transmigrating in the presence of the chemoattractant divided by the number of transmigrating cells in the absence of the chemoattractant. (C) 5×10⁶ untreated or AMD3100-treated cells were added to stromal layers, and after a 3-h incubation, cells that had migrated to the stromal layer were counted as described in the Online Supplementary Appendix.

$\pm 2.1\%$ migrated into the stromal layer. Compared with the untreated control samples, 30 min of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD3100 treatment reduced the number of migrating cells to only $4.5 \pm 2.0\%$, corresponding to an inhibition of $68.18 \pm 7.4\%$ ($n=10$, $P=0.0020$) compared with the control cell pseudoemperipolesis (Figure 2C).

Altogether, these results demonstrated that AMD3100, by interfering with SDF1- α , is a strong inhibitor of CLL cell cytoskeleton rearrangement and blocks the chemotaxis and migration of the leukemia cells.

AMD3100 reduces viability and restores apoptosis in MNC from CLL patients cultured with SDF-1 α , MSC or NLC

To better analyze the role of AMD3100 on MNC from CLL patients in various cellular microenvironments, we decided to co-culture them with the MSC and NLC, which were previously characterized (see *Online Supplementary Appendix* for results). MNC from CLL patients were pre-treated or not with AMD3100 and cultured in the presence or absence of SDF-1 α (Figure 3A and D), an MSC layer (Figure 3B and E) or NLC (Figure 3C and F). After a 48-h incubation, apoptosis (% annexin positive cells including early and late apoptosis) and cell viability (% viable cells) were evaluated. Our results showed that spontaneous apoptosis was significantly reduced, and cell viability was improved with SDF-1 α or in the presence of both cellular microenvironments ($n=8$, $P<0.0001$). Moreover, when MNC from CLL patients were cultured alone, AMD3100 did not have a significant effect on apoptosis or viability ($n=8-10$, $P>0.7422$). In contrast, when MNC from CLL patients were cultured with SDF-1 α or an MSC-based or NLC-based microenvironment, apoptosis was significantly increased and viability decreased after AMD3100 treatment ($n=8-10$, $P<0.01$) (Figure 3). A representative annexin V/PI staining image is presented in the *Online Supplementary Appendix*. Interestingly, AMD3100 did not have an effect on the expression of two anti-apoptotic proteins (MCL-1 and FLIP) when MNC from CLL patients were cultured alone but clearly decreased the expression of these two proteins in a CLL/NLC co-culture ($n=4$). A representative case is shown in Figure 3G.

Taken together, these results suggest that interfering with the SDF1 α /CXCR4 axis using AMD3100 antagonizes the protective effect of MSC-based or NLC-based microenvironment on MNC from CLL patients that become more sensitive to apoptosis.

AMD3100 sensitizes MNC from CLL patients to drug-induced apoptosis in a CLL/MSC co-culture model

As suggested previously by Kurtova *et al.*, a co-culture model with a protective microenvironment seems to be very important for studying drug-induced apoptosis of CLL cells.¹⁷ Therefore, we measured the viability and apoptosis of MNC from CLL patients cultured with or without an MSC layer without any drug, with or without AMD3100 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and with fludarabine (3 μM), cladribine (0.5 μM), methylprednisolone (10 μM), valproic acid (1 mM), bortezomib (5 nM) and flavopiridol (50 nM). After subtracting the spontaneous apoptosis, we observed that only in the presence of an MSC microenvironment, AMD3100 increased the degree of apoptosis induced by each drug ($n=10$, $P<0.05$), while viability (after normalization to cells plated alone without AMD3100 or any drugs) was statistically decreased ($n=10$, $P<0.05$) (Figure 4). A

representative annexin V/PI staining image is presented in the *Online Supplementary Appendix*. These results demonstrated that antagonizing the SDF-1 α /CXCR4 axis leads to higher drug-induced apoptosis in MNC from CLL patients when they are in a bone marrow stromal environment.

Discussion

This last decade, increasing attention has been focused on the tumoral microenvironment and its contribution to the survival of malignant cells.²³ Our group was among the first to observe the survival advantage conferred by an *in vitro* MSC microenvironment to CLL cells.^{4,7} In addition, Burger *et al.* showed that NLC and SDF-1 α played a crucial role in the migration, homing and survival of CLL cells, and that this survival protection was mediated through the SDF-1 α /CXCR4 axis.⁸ In the present work, we interfered with the SDF-1 α /CXCR4 axis using AMD3100, a well-known and tolerated drug. AMD3100 has been used in humans for more than ten years²⁴ and clinical phases have shown that AMD3100 has modest and tolerable side effects.²⁵⁻²⁶ Here, we observed that AMD3100 could interfere with CLL cell trafficking by inhibiting actin polymerization and cell migration in response to SDF-1 α and pseudoemperipolesis. Results are in line with those observed by Burger *et al.*²⁷

When CLL cells are cultured *in vitro*, they rapidly undergo spontaneous apoptosis; but this can be prevented by culturing them with SDF-1 α , MSC or NLC.⁷⁻⁸ Here, we show that AMD3100 treatment leads to a higher rate of spontaneous apoptosis and decreased viability in each of these 3 situations. However, AMD3100 could only partially restore apoptosis levels compared with the single culture system, probably because of other unknown mechanisms, such as cytokines and other interactions likely involved in the survival of CLL cells. This phenomenon was previously observed by Burger *et al.* who did not detect a significant degree of apoptosis inhibition with another CXCR4 antagonist (T140 analog).⁸ In our study, we also found some cases in which cell apoptosis was only increased by about 5-10% after AMD3100 treatment. However, in each experiment, we show a partial restoration of apoptosis, making our data significant. These data were strengthened by the reduced expression of important anti-apoptotic proteins, such as MCL-1 or FLIP, when we cultured MNC from CLL patients with NLC, indicating again that AMD3100 was able to partially restore apoptosis.

In 2009, Kurtova *et al.* proposed a co-culture model based on diverse bone marrow stromal cell types to study *in vitro* the effect of drugs in a more reliable and reproducible manner.¹⁷ Therefore, we investigated the effect of a combination of different drugs that are currently being investigated or used for hematologic malignancies, with or without AMD3100, and in the presence/absence of an MSC stromal layer, mimicking CLL cell/MSC interactions that occur in the bone marrow. For all drugs tested, we demonstrate that AMD3100 increased the degree of drug-induced apoptosis and decreased cell viability. As for our previous experiments, the restoration of apoptosis was not complete due to the reasons discussed above, but the effect was clearly significant. Burger *et al.* obtained similar results with fludarabine and another CXCR4 antagonist (T140 analog).²⁷ In the present study, we show that the

adjuvant effect of a CXCR4 antagonist such as AMD3100 could be observed not only with fludarabine but also with other drugs (cladribine, methylprednisolone, valproic acid, bortezomib and flavopiridol) currently used or under investigation for CLL treatment. This is also particularly important in the context of lymph node (LN) niches;²³ indeed, the LN microenvironment (including NLC) may provide a safe haven from cytotoxic anticancer drugs thus serving as a tumor reservoir from which relapse occurs, and where CLL cells could proliferate and accumulate genetic mutations that favor disease progression. Since AMD3100 disrupts the cross-talk between MNC of CLL

patients and NLC, we can expect that it will also mobilize CLL cells from protective LN niches.

As mentioned previously, different CXCR4 antagonists are available.¹¹ Several interesting studies have been performed with the T140 analogs, small peptide inhibitors of CXCR4 receptors.²⁷⁻²⁸ However, T140 analogs have not yet been approved by the Food and Drug Administration (FDA). In contrast, AMD3100 has been FDA-approved since 2009; it has been investigated in clinical trials and displays moderate and tolerable side effects.²⁵⁻²⁶ For all these reasons, we decided to investigate AMD3100 instead of other CXCR4 antagonists such as T140 analogs.

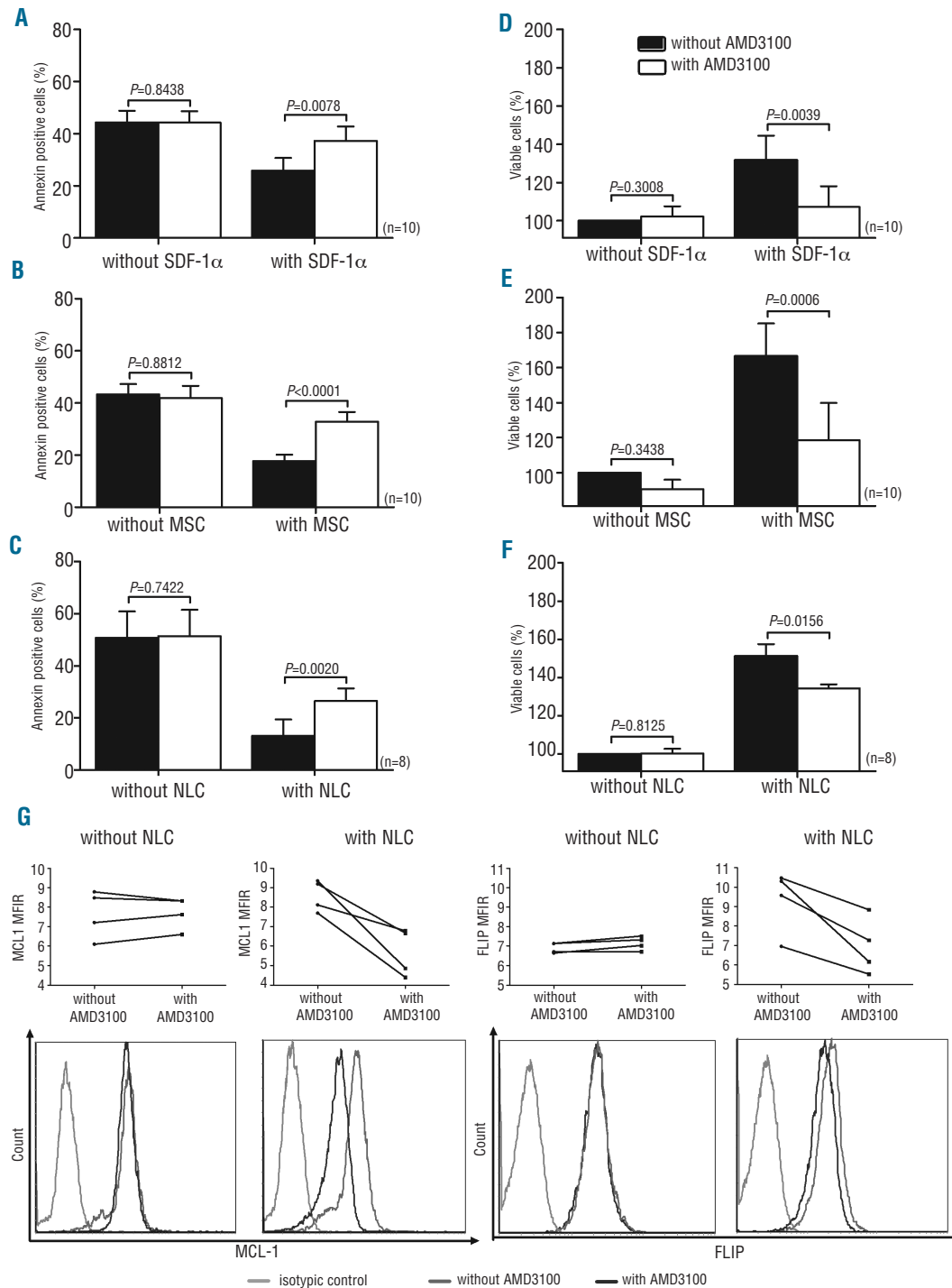


Figure 3. AMD3100 restores apoptosis and decreases the viability of CLL cells in the presence of an MSC-based or NLC-based microenvironment or SDF-1 α . MNC isolated from CLL patients were treated or not with AMD3100 and then cultured alone or with SDF-1 α (A, D), MSC (B, E) or NLC (C, F), and apoptosis and cell viability were measured after 48 h. The rates in the figure include early and late apoptosis. Viability rates were obtained after normalizing the results to those for untreated cells. Each bar represents the mean \pm SEM of 8-10 experiments. (G) MCL1 and FLIP expression were evaluated by flow cytometry in 4 patients in different conditions (with/without AMD3100; with/without NLC) and MFIR representing MCL1 or FLIP expression over isotopic signal were plotted for each case. A representative case of intracellular staining for MCL1 and FLIP protein on CD19⁺ cells is provided for the different situations.

In addition, a currently ongoing clinical phase I/II trial combining AMD3100 with rituximab in CLL patients mirrors our choice of CXCR4 inhibitor. Indeed, the preliminary results of this study presented at the American Society of Hematology 2010 meeting indicate that this combination is safe, well tolerated and could potentially

provide interesting results.

In conclusion, we suggest the potential benefit of CXCR4 antagonist therapies using AMD3100 in CLL. AMD3100 inhibits CLL cell trafficking, mobilizes CLL cells from tissues, thereby disrupting the cell/MSC-based or NLC-based microenvironment interactions and partially blocking sur-

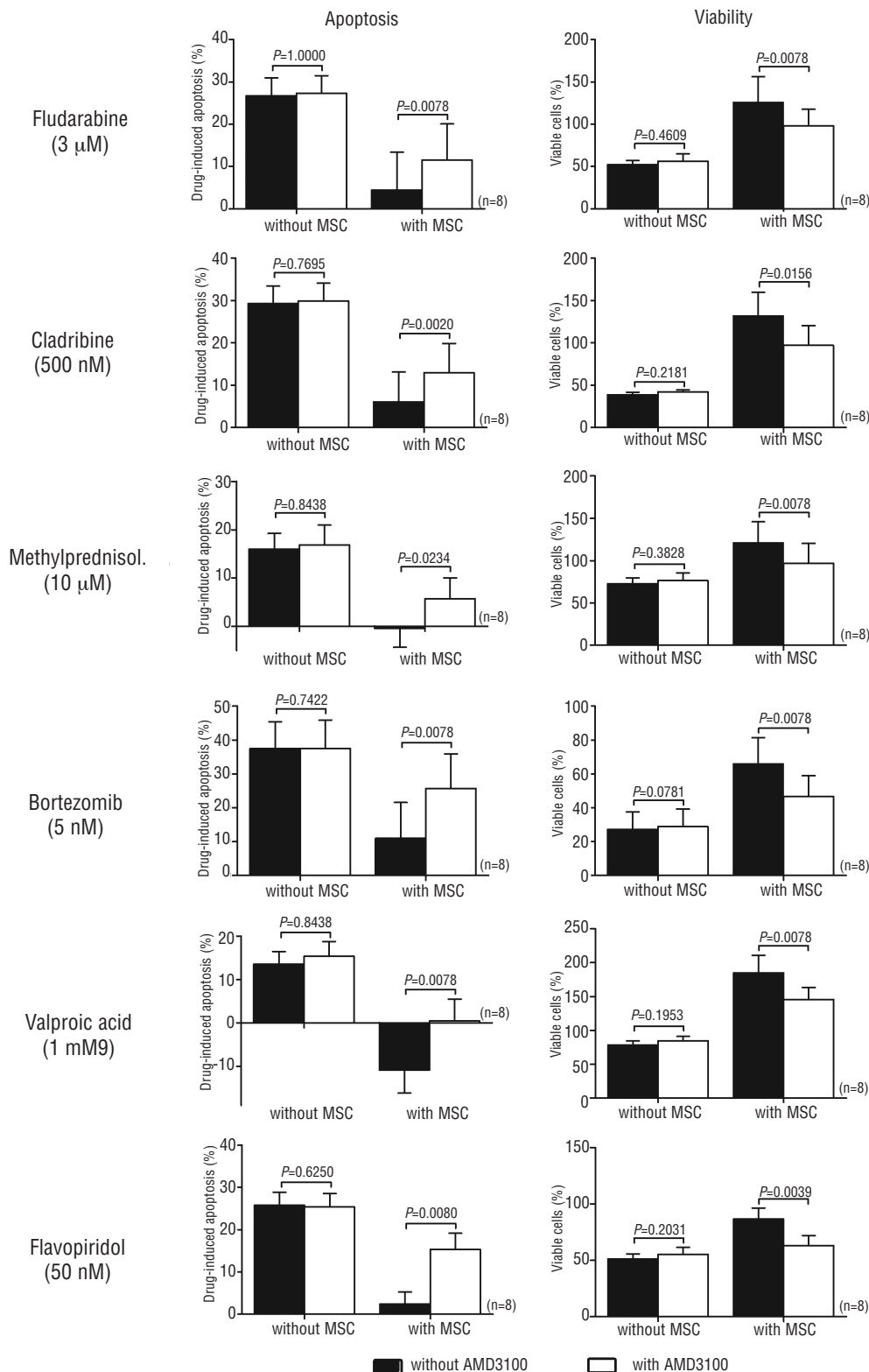


Figure 4. AMD3100 sensitizes CLL cells to drug-induced apoptosis in a CLL/MSC co-culture model. MNC isolated from CLL patients were treated or not with AMD3100 and then cultured with or without various drugs. Apoptosis and cell viability were measured after 48 h, as described in the *Design and Methods* section. The rates in the figure include early and late apoptosis. The drug-induced apoptosis rates were obtained after subtracting the spontaneous apoptosis, while the viability rates were obtained after normalization to untreated cells. Each bar represents the mean ± SEM of 8 experiments.

vival stimuli, and also interferes with the survival signal provided by SDF-1 α . Through these mechanisms, AMD3100 enhanced the sensitivity of CLL cells to all tested drugs. Taken together, these data demonstrate that using AMD3100 to interfere with the SDF-1 α /CXCR4 axis could represent a new therapeutic modality, and that combining AMD3100 with other conventional agents may thus be a promising therapeutic approach for killing CLL cells.

Authorship and Disclosures

The information provided by the authors about contributions from persons listed as authors and in acknowledgments is available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

Financial and other disclosures provided by the authors using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are also available at www.haematologica.org.

References

- Defoiche J, Debacq C, Asquith B, Zhang Y, Burny A, Bron D, et al. Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2008;143(2):240-7.
- Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood.* 1991;78(8):1901-14.
- Collins RL, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RJ, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol.* 1989;71(3):343-50.
- Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M, Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 1999;35(5-6):445-53.
- Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;123(3):380-8.
- Stamatopoulos B, Haibe-Kains B, Equeter C, Meuleman N, Soree A, De Bruyn C, et al. Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA. *Haematologica.* 2009;94(6):790-9.
- Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood.* 1998;91(7):2387-96.
- Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 2000;96(8):2655-63.
- Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood.* 1999;94(11):3658-67.
- Mohle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia.* 1999;13(12):1954-9.
- Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia.* 2009;23(1):43-52.
- Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, et al. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med.* 1998;4(1):72-7.
- Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood.* 2003;102(8):2728-30.
- Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Duvillier H, Massy M, Martiat P, et al. Quantification of ZAP70 mRNA in B cells by real-time PCR is a powerful prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem.* 2007;53(10):1757-66.
- Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood.* 2009;113(21):5237-45.
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005;23(8):1105-12.
- Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood.* 2009;114(20):4441-50.
- Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Lagneaux L. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis, down-regulates the CXCR4 chemokine receptor and impairs migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2010;95(7):1136-43.
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, et al. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003;101(6):2328-34.
- Perez-Galan P, Marzo I, Giraldo P, Rubio-Felix D, Laserra P, Larrad L, et al. Role of caspases and apoptosis-inducing factor (AIF) in cladribine-induced apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002;16(10):2106-14.
- Boelens J, Lust S, Van Bockstaele F, van Gele M, Janssens A, Derycke L, et al. Steroid effects on ZAP-70 and SYK in relation to apoptosis in poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2009;33(10):1335-43.
- Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Mineur P, Martiat P, Bron D, et al. Antileukemic activity of valproic acid in chronic lymphocytic leukemia B cells defined by microarray analysis. *Leukemia.* 2009;23(12):2281-9.
- Munk Pedersen I, Reed J. Micro-environmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma.* 2004;45(12):2365-72.
- Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, et al. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1667-73.
- Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;37(2):1253-62.
- Cashen A, Lopez S, Gao F, Calandra G, MacFarland R, Badel K, et al. A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(11):1253-61.
- Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;106(5):1824-30.
- Buchner M, Brantner P, Stickel N, Prinz G, Burger M, Bar C, et al. The microenvironment differentially impairs passive and active immunotherapy in chronic lymphocytic leukaemia - CXCR4 antagonists as potential adjuvants for monoclonal antibodies. *Br J Haematol.* 2010;151(2):167-78.

AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments

Basile Stamatopoulos,¹ Nathalie Meuleman,¹ Cécile De Bruyn,¹ Karlien Pieters,¹ Philippe Mineur,² Christine Le Roy,³ Stéphane Saint-Georges,³ Nadine Varin-Blank,³ Florence Cymbalista,^{3,4} Dominique Bron,⁵ and Laurence Lagneaux¹

¹Laboratory of Clinical Cell Therapy, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium; ²Department of Hemato-Oncology, Grand Hôpital de Charleroi, Gilly, Belgium; ³UMR U978 INSERM (Adaptateurs de Signalisation en Hématologie), Université Paris Nord, PRES Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France; ⁴Department of Hematology, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; and ⁵Department of Hematology, Institut Jules Bordet, Brussels, Belgium

Citation: Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Pieters K, Mineur P, Le Roy C, Saint-Georges S, Varin-Blank N, Cymbalista F, Bron D, and Lagneaux L. AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 2012;97(4):608-615. doi:10.3324/haematol.2011.052779

Online Supplementary Appendix

Reagent and antibodies

AMD3100 (A5602), fludarabine (F-Ara-A, F2773), cladribine (C4438), valproic acid (P4543) and favopiridol (F3055) were obtained from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Recombinant human SDF-1 α was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Methylprednisolone (Solu-medrol) was obtained from Pfizer (Puurs, Belgium). Bortezomib was kindly provided by Janssen-Cilag, Belgium. Fludarabine, valproic acid, flavopiridol and bortezomib were dissolved in water. AMD3100 and SDF-1 α were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS). Cladribine was dissolved in PBS/ethanol (1:1). Stock solutions (1 mM) were stored at -20°C. Propidium iodide (PI), 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6), annexin-V, and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) were purchased from Invitrogen (Merelbeke, Belgium). The anti-CXCR4 (12G5, n. 551510) antibody was purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA). All other cell surface monoclonal antibodies were purchased from Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, Germany). The Fix and Perm Permeabilization kit was obtained from Fisher Scientific (Erembodegem, Belgium). The vimentin (3B4 - M7020) anti-

body was purchased from Prospan (Merelbeke, Belgium), and the MCL-1 (22 - sc-12756) and FLIP (G11 - sc-5276) antibodies were purchased from Biosource (Nivelles, Belgium).

MNC from CLL patients culture condition

Mononuclear cells (MNC) of CLL patients were isolated from peripheral blood using density gradient centrifugation (Linfocsep, Biomedics, Spain). The cells were immediately cultured (2×10^6 cells/mL) in RPMI 1640 (Lonza Europe, Verviers, Belgium) supplemented with streptomycin, penicillin, 2 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide.

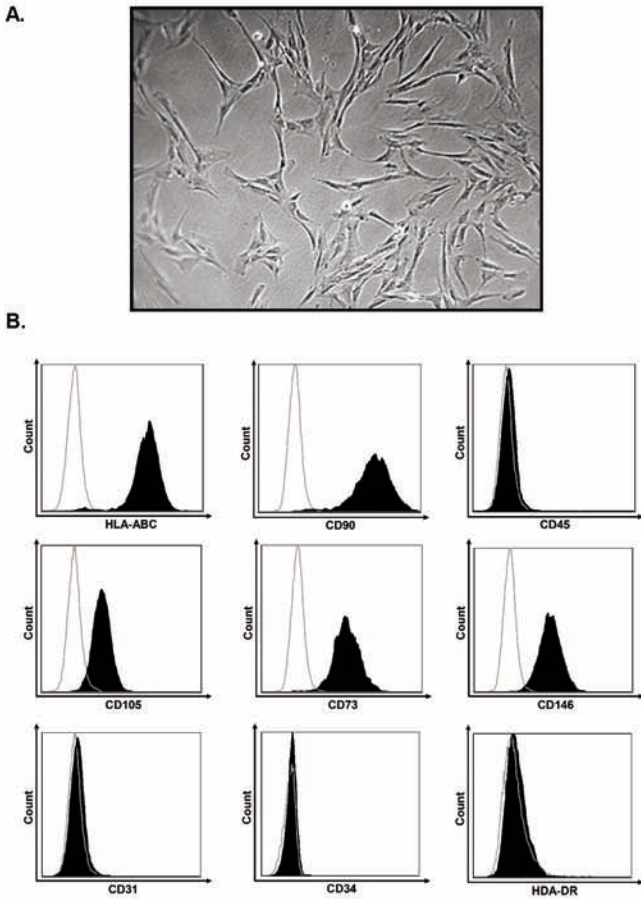
Phenotypic analysis of MSC and NLC

Phenotypic analysis was performed by flow cytometry using CD3, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD64, CD73, CD90, CD105, CD146, HL-DR, ABC, and vimentin monoclonal antibodies, as previously described.¹ Cytoplasmic vimentin level was determined in CD19-labeled cells using the Fix and Perm Permeabilization kit according to the manufacturer's recommendations. Results are shown in the *Online Supplementary Figure S1* and are in line with previous reports.^{1,2}

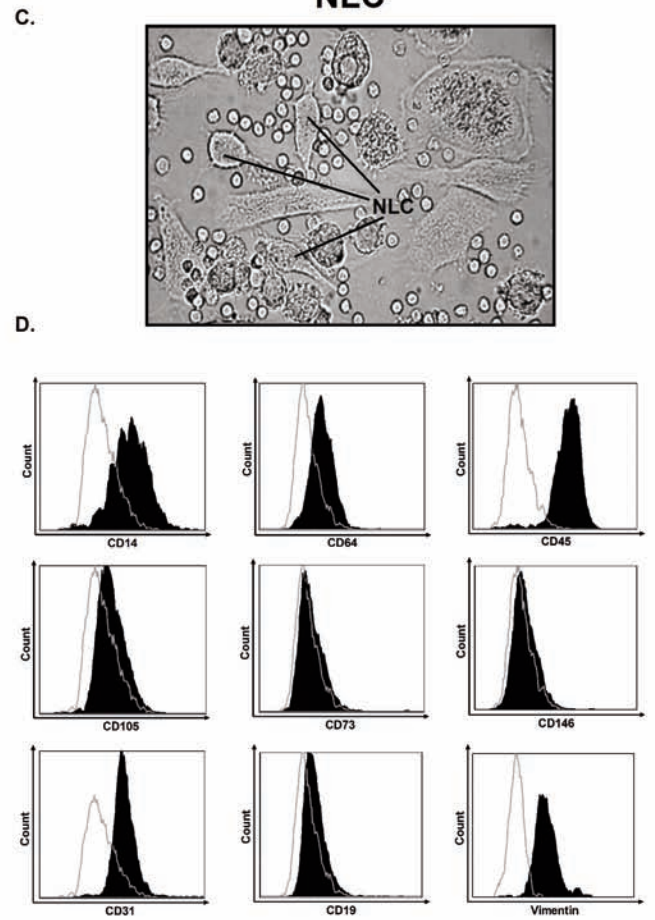
References

1. Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy*. 2009;11(5):570-83.
2. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96 (8):2655-63.

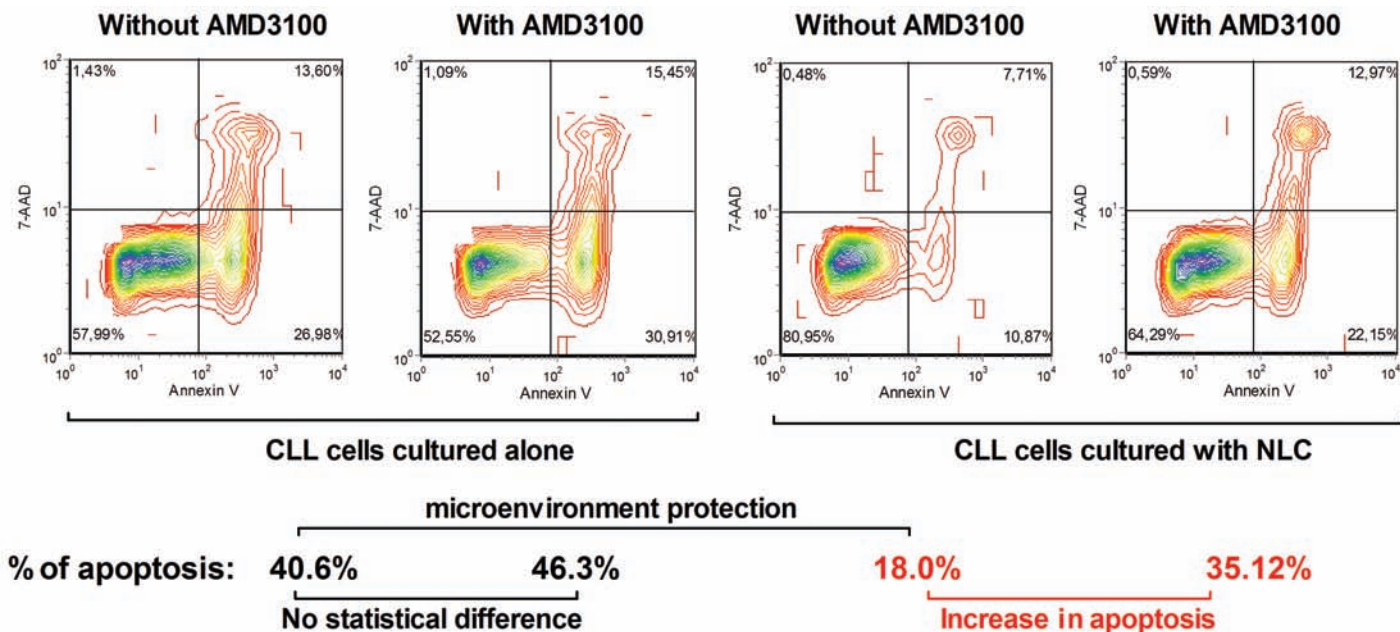
MSC



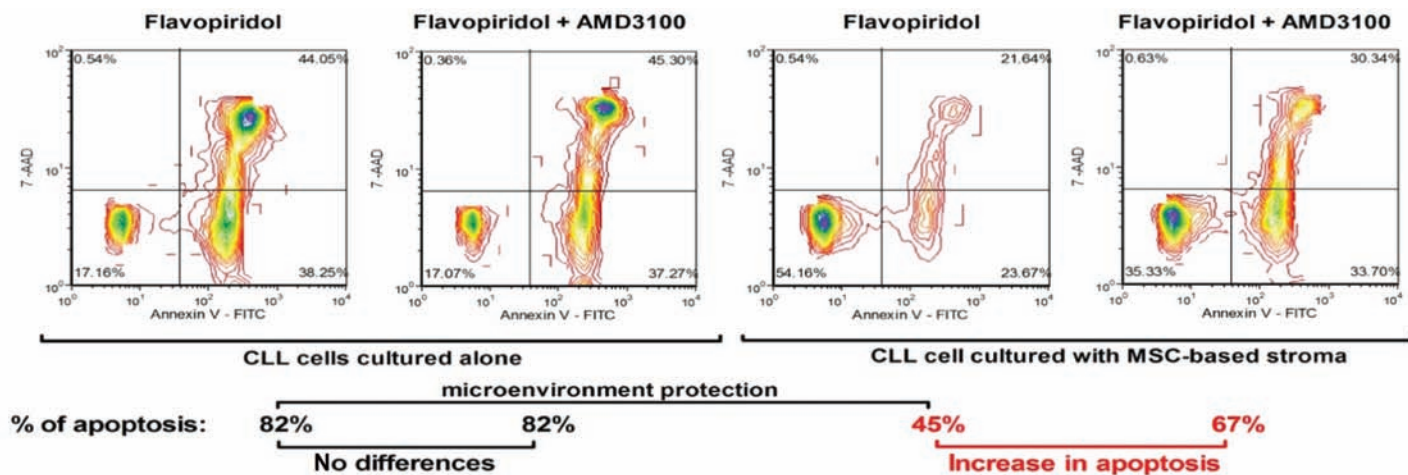
NLC



Online Supplementary Figure S1. Morphological and phenotypical characterizations of MSC and NLC. Photography of MSC (A) and NLC (C). Phenotypic characterization of MSC (B) revealed that MSC are negative for hematopoietic markers (CD34, CD45), for endothelial marker (CD31) and positive for putative mesenchymal markers (CD105, CD73, CD146, CD90). MSC are negative for HLA-DR but positive for HLA-ABC. Phenotypic characterization of NLC (D) revealed that NLC are positive for hematopoietic markers (CD45), for monocyte/macrophage marker (CD64, CD14), for endothelial marker (CD31) and negative for B-cell marker (CD19) and putative mesenchymal markers (CD105, CD73, CD146). NLC are also positive for vimentin.



Online Supplementary Figure S2. AMD3100 restores apoptosis in presence of an MSC-based or NLC-based microenvironment. Representative annexin V/7-AAD staining on CD19⁺ cells with/without AMD3100 and with/without NLC. In absence of NLC, AMD3100 did not have a statistical effect on apoptosis. In presence of NLC, spontaneous apoptosis of MNC from CLL patients was reduced but AMD3100 partially restores this apoptosis.



Online Supplementary Figure S3. AMD3100 sensitizes MNC from CLL patients to drug-induced apoptosis in presence of an MSC-based microenvironment. Representative annexin V/7-AAD staining on CD19⁺ cells with/without AMD3100, with/without flavopiridol and with/without MSC. In absence of MSC, AMD3100 did not have a statistical effect on drug-induced apoptosis. In presence of MSC, drug-induced apoptosis of MNC from CLL patients was reduced but AMD3100 partially restores this apoptosis.

Online Supplementary Table S1. Clinical characteristics of chronic lymphocytic leukemia patients. UM: unmutated; M, mutated; ND: not done. IGHV mutational status and ZAP70 are based, respectively, on 98% and 20% cut-off values (commonly accepted in the literature). Optimal cut off for CD38, determined by ROC curve analysis, was 7%. Cytogenetic abnormalities were investigated by conventional karyotype analysis and a CLL FISH panel detecting del(17p), del(11q), del(6q), del(13q) and trisomy 12.

	Age (years)	Sex	Binet stage	White blood cell count (x 10 ⁹ /L)	CD5/CD19 (%)	IGHV mutational status	ZAP70	CD38	Cytogenetic abnormalities
1	55	M	A	68	90	UM	+	+	del(13q-) del(11q)
2	51	F	B	138	95	UM	+	+	del(11q)
3	45	F	A	193	99	UM	+	-	del(13q)
4	75	M	A	36.2	75	M	-	+	trisomy 12
5	77	M	A	34	75	M	-	+	del(13q)
6	69	M	A	25.3	80	M	-	-	del(13q)
7	62	M	A	145.8	94	M	+	+	del(13q)
8	76	M	A	108.7	76	UM	+	+	ND
9	59	M	A	32.9	90	M	-	-	ND
10	53	F	A	115	96	M	-	+	ND
11	73	M	A	20.7	72	M	-	+	normal
12	72	F	A	71.2	56	M	-	-	normal
13	46	F	B	78	94	UM	+	-	del(13q)
14	65	M	C	60.7	91	M	-	+	del(6q)
15	78	M	B	35.8	79	UM	+	+	trisomy 12
16	62	M	A	22.1	89	M	-	-	del(16q)
17	68	M	A	74.4	73	UM	+	+	del(11q)
18	72	F	A	25.4	75	M	-	-	del(17q)
19	52	F	A	14.8	76	M	-	-	normal
20	48	F	A	25.7	90	M	-	-	del(13q)
Summary	64.3	12 M 8 F	17 A 3 B 1 C	71.4	83.3	7 UM 13 M	8 + 12 -	11 + 9 -	7 unfavorable 9 favorable 3 ND

IX. Discussion et perspectives

La réponse CXCR4 est associée à l'évolutivité de la LLC

L'importance physiopathologique de la stimulation antigénique dans la LLC est aujourd'hui soutenue par de nombreux travaux de recherche [171, 198, 307]. Dans ce contexte, les travaux issus de notre laboratoire ont montré que la stimulation du BCR était fortement corrélée à l'évolutivité de la LLC et que *in vitro*, cette stimulation entraînait un avantage de survie des cellules de LLC associé à une activation des effecteurs impliqués dans les voies de signalisation du BCR (SYK, PLC γ 2, NFAT2) [199, 200, 308]. Notre hypothèse de travail, à la base de notre étude, reposait sur le fait que la stimulation antigénique pourrait également induire des altérations du processus de recirculation/trafic des cellules malignes en liaison avec la progression de la maladie.

Nous avons initié cette étude en analysant l'impact de la stimulation du BCR des cellules de LLC sur l'expression membranaire du CXCR4 et du CD62L, deux effecteurs impliqués dans le trafic intra-ganglionnaire et la sortie du ganglion des LB. Nos travaux présentés dans l'article 1 et publiés dans la revue *Cancer Research* montrent que la stimulation soutenue du BCR par un anti-IgM immobilisé entraîne une diminution concomitante du CXCR4 et du CD62L à la surface cellulaire. Cette diminution est le résultat d'une internalisation du CXCR4 et d'un shedding du CD62L.

Par ailleurs et de manière très intéressante, les diminutions du CXCR4 et du CD62L en réponse au BCR ne sont majoritairement observées que dans les cellules de patients présentant des marqueurs de mauvais pronostic et la capacité des cellules à répondre à la stimulation du BCR en terme de down-régulation du CXCR4 est corrélée avec l'évolutivité de la LLC.

Voies de signalisation du BCR impliquée dans l'internalisation du CXCR4 : rôle des PKD

Dans la continuité de ce travail, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation du BCR impliquées dans l'internalisation du CXCR4 (article 2). Il a été montré que l'internalisation du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR des cellules DT40 est dépendante de la PLC γ 2 [262], suggérant dans ce modèle que les PKC (activables par le DAG) seraient impliqués dans l'internalisation du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR. D'autres études basées sur l'utilisation du PMA ont permis de mettre en évidence une implication des PKC dans l'internalisation du CXCR4 [256, 260]. Dans ce contexte, il a été établi que les LB-LLC expriment plusieurs isoformes

de PKC ($\alpha, \beta, \delta, \epsilon$) [205] et notre étude a permis de mettre en évidence que les LB-LLC expriment majoritairement les isoformes PKD2 et PKD3 alors que la PKD1 n'est pas détectée. Ces données sont à mettre en relation avec des résultats précédents décrivant une expression de la PKD2 et non de la PKD1 dans des ganglions réactifs de patients atteints de lymphomes non hodgkinien incluant la LLC [309].

Le rôle fonctionnel des PKD2/3 dans la down-régulation du CXCR4 induite par le BCR a ensuite été démontré à l'aide d'un panel d'inhibiteurs (Gö6983, Gö6976, GF109203X) ayant des spécificités différentielles vis-à-vis des PKC et PKD. Afin de confirmer l'implication des PKD dans ce processus, nous avons ensuite utilisé un inhibiteur sélectif des PKD, le CID755673. Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité du CID755673 sur l'activation des PKD2/3 dans les cellules de LLC en mettant en évidence une diminution de la phosphorylation basale et induite par le BCR de la serine 916 des PKD. Nous avons ensuite montré que l'inhibition des PKD2/3 par le CID755673 entraînait un blocage de la down-régulation du CXCR4 dépendante de la stimulation du BCR.

Le CID755673 inhibant indistinctement les 3 isoformes de PKD [310], cette stratégie ne permet pas d'identifier avec certitude laquelle des isoformes PKD2 et/ou PKD3 est impliquée dans la réponse à la stimulation du BCR. Pour répondre à cette question, nous avons envisagé d'effectuer prochainement deux stratégies :

- Une inhibition spécifique des isoformes PKD2 et PKD3 par siRNA [311] et une évaluation de leur impact sur l'internalisation du CXCR4
- Une introduction de formes mutées constitutivement actives de PKD2 et/ou PKD3 dans les LB-LLC et une analyse de leur effet sur l'expression de CXCR4 à la surface cellulaire. Nous disposons de ces deux plasmides au laboratoire et avons déjà vérifié le niveau d'expression des protéines mutées dans des cellules 293T transfectées par ces plasmides.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois que dans les LB-LLC, la famille des PKD (PKD2 et PKD3) est impliquée dans la signalisation du BCR conduisant à l'internalisation du CXCR4.

Voies d'activation des PKD en réponse à la stimulation du BCR des LB-LLC

Il a été clairement établi que l'activation de la PKD en réponse au BCR nécessite sa phosphorylation sur les résidus Ser⁷⁴⁴ et Ser⁷⁴⁸ et que l'autophosphorylation sur la Ser⁹¹⁶ qui dépend du domaine kinase de la PKD est le reflet de l'état d'activation de la protéine [281, 284].

Dans notre étude, nous avons montré que la stimulation du BCR (30min) entraîne une augmentation de la phosphorylation des PKD sur les Ser^{744/748} et la Ser⁹¹⁶ (absente sur la PKD3) et que la phosphorylation des Ser^{744/748} dépend de la PI3K. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature qui montrent dans les LB de souris que l'activation des PKD en réponse à la stimulation du BCR requière les protéines Vav, PI3K et PLC γ 1 et 2 [301].

De manière générale, la phosphorylation sur les Ser^{744/748} a été décrite comme étant dépendante des PKC et plusieurs études effectuées dans des modèles cellulaires différents, ont permis de démontrer une activation des PKD dépendante des PKC en réponse à la stimulation du BCR :

Dans les cellules B DT40 de poulet et les lignées B humaines Raji et Ramos, la stimulation brève du BCR (<5min) conduit à l'activation de la PKD3 de manière PLC γ et PKC dépendante [298].

Dans des splénocytes de souris, la PKC δ est associée au BCR et elle est impliquée dans la phosphorylation de la PKD en réponse à la stimulation brève (<15min) du BCR [302].

Cependant, nos résultats obtenus avec les inhibiteurs des PKC (Gö6983, GF109203X) suggèrent que les PKC ne seraient pas impliquées dans la diminution du CXCR4 dépendante des PKD2/3 et en réponse à une stimulation soutenue du BCR (24h). Ces différences de mécanismes pourraient s'expliquer par les temps d'activation différentielle du BCR effectués dans ces études. En effet, deux études ont montré que la stimulation des récepteurs RCPG entraîne une phosphorylation précoce (1-5min) des Ser^{744/748} dépendante des PKC suivie d'une phosphorylation plus tardive (>45min) de ces mêmes résidus mais de manière indépendante des PKC [282, 283]. Ceci suggère qu'en réponse à une stimulation soutenue, la phosphorylation des PKD sur les Ser⁷⁴⁴ et 748 deviendrait indépendante des PKC.

Afin d'approfondir nos données et de confirmer la non implication des PKC dans l'internalisation du CXCR4, nous envisageons d'analyser la dépendance à court terme (30min) et l'indépendance à long terme (24h) des PKC sur le processus de phosphorylation des Ser^{744/748} des PKD après une stimulation du BCR pendant 30min ou 24h. Il est à noter qu'une phosphorylation des Ser^{744/748} est toujours observée après 24h de stimulation soutenue du BCR (figure supplémentaire S4, article 2).

De plus, nous avons montré que l'inhibition de la PI3K par le LY294002 ou par l'inhibiteur spécifique de la PI3K δ CAL101, entraîne une diminution de la phosphorylation des Ser^{744/748} et bloque l'internalisation du CXCR4 suite à la stimulation du BCR des LB-LLC. Nos données indiquent donc que dans les cellules de LLC, la PI3K(δ) est un activateur des PKD2/3 en réponse à la stimulation du BCR et permettent ainsi de mettre en évidence une nouvelle voie BCR, PI3K, PKD dépendante, impliquée dans l'internalisation du CXCR4.

La stimulation du BCR induit la phosphorylation du CXCR4 dans les LB-LLC

Il a été montré que le domaine C-terminal du CXCR4 contient un motif S₃₂₄S₃₂₅KILL (Fig. 46) important pour l'internalisation du récepteur induite par le BCR et le PMA [262]. De plus, de nombreuses études ont montré qu'une activation par le PMA entraîne une augmentation de la phosphorylation des résidus Ser³²⁴ et Ser³²⁵ associée à une internalisation du CXCR4. De plus, une analyse "*in silico*" nous a permis d'identifier les Ser^{324/325} comme des acides aminés potentiellement phosphorylables par les PKD au sein du motif VSRGS₃₂₄S₃₂₅. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse et nous avons montré pour la première fois que la stimulation du BCR entraînait une phosphorylation des Ser^{324/325} du CXCR4 de manière dépendante des PKD2/3.

Dans le but d'approfondir ces résultats, nous envisageons de faire le lien entre la phosphorylation du CXCR4 et son internalisation en analysant par imagerie cellulaire la localisation subcellulaire du CXCR4 en fonction de du statut de phosphorylation des Ser^{324/325}.

La stimulation antigénique perturberait le trafic des LB-LLC in vivo

La LLC est caractérisée par une infiltration ganglionnaire dont les mécanismes impliqués ne sont pas encore clairement établis. Ceci est dû notamment à l'absence de modèles *ex-vivo* et *in vivo* permettant de mieux comprendre ces mécanismes. Basé sur l'importance physiologique de la stimulation antigénique sur la régulation du trafic intra-ganglionnaire des LB, nous avons analysée dans les LB-LLC, l'impact fonctionnel de la stimulation du BCR sur les processus de migration et d'adhésion cellulaire dépendant respectivement du CXCR4 et du CD62L.

Nous avons montré que la diminution de l'expression du CXCR4 dépendante du BCR est associée à une diminution des capacités de migration *in vitro* des cellules de LLC en réponse au CXCL12. De même, la diminution de l'expression du CD62L induite par la stimulation du BCR est associée à une réduction des capacités d'adhésion des cellules de LLC sur une sous-couche de cellules endothéliales lymphatiques. Connaissant le rôle clé de ces deux effecteurs dans le trafic ganglionnaire et la sortie des LB du ganglion (Chap. III.2.4.2 de l'introduction), nos résultats nous ont conduit à proposer un modèle selon lequel la stimulation antigénique des cellules de LLC des patients évolutifs provoquerait leur rétention au sein des ganglions, favorisant ainsi leur contact avec le microenvironnement et leur survie *in vivo*.

Nos résultats obtenus *in vitro* suggèrent un rôle déterminant de la stimulation du BCR et plus généralement du microenvironnement tumoral, dans l'altération du trafic ganglionnaire des cellules de

LLC. Afin de se rapprocher au plus près des conditions rencontrées chez le patient *in vivo*, nous développons actuellement une approche *ex vivo* consistant à analyser en temps réel, l'effet de la stimulation antigénique sur la dynamique intra-ganglionnaire de cellules de LLC déposées sur des coupes fraîches et épaisses de ganglion humain.

Stratégies thérapeutiques ciblant le CXCR4 et les PKD.

Malgré la bonne efficacité de la chimio-immunothérapie conventionnel qui prolonge la survie de certains patients, elle est inefficace pour l'éradication du clone tumorale dans la moelle ou le ganglion [226]. Cette observation peut s'expliquer par le fait que les cellules stromales offrent aux LB-LLC une protection contre l'apoptose induite par les drogues [139]. Burger et al. ont de plus mis en évidence l'importance de l'interaction CXCR4-CXCL12 dans les processus de survie cellulaire d'attraction/rétention des LB-LLC dans le microenvironnement médullaire [142].

Dans ce contexte, nous avons analysé l'effet d'un antagoniste du CXCR4, l'AMD3100 sur les capacités de migration *in vitro* des LB-LLC. Nos résultats révèlent que l'AMD3100 entraîne une diminution significative de la migration induite par le CXCL12 (article 3), suggérant qu'*in vivo*, cette drogue permettrait de perturber le trafic et surtout l'attraction/rétention des LB-LLC au sein du microenvironnement médullaire. Ces résultats *in vitro* sont en accord avec des résultats préliminaires montrent une mobilisation dose dépendante des LB-LLC dans le sang des patients traités par l'AMD3100 [138].

Le lénalidomide est une drogue immuno-modulatrice qui présente une efficacité anti-tumorale dans la LLC sans pour autant avoir un rôle pro-apoptotique direct sur les cellules B de LLC *in vitro*, suggérant que son effet serait dépendant de facteurs liés au microenvironnement. Nous avons évalué *in vitro* l'impact de cet immuno-modulateur sur l'expression membranaire du CXCR4. Nous avons observé sur des PBMC et LB de LLC, qu'un traitement au lénalidomide entraîne une légère diminution significative du CXCR4 membranaire (données non montrées).

Une étude a par ailleurs montré dans les cellules de LLC que l'augmentation de la synthèse de molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) induite par le lénalidomide est dépendante de la PI3K [245]. Nous avons ainsi cherché à mettre en évidence l'implication de la PI3K dans la diminution du CXCR4 induite par le lénalidomide. Nos résultats (non montrés) indiquent que l'effet du lénalidomide sur la diminution du CXCR4 est inhibé par le LY294002. Sachant que le CXCR4 semble jouer un rôle important dans la sortie des cellules de LLC du ganglion, la diminution du CXCR4 par le

légalidomide (tout comme celle induite par la stimulation du BCR), pourrait être considérée comme un effet délétère en favorisant leur rétention ganglionnaire. Ainsi, l'association d'un inhibiteur de la PI3K, tel que CAL101 actuellement en essai clinique, avec le légalidomide présenterait un intérêt clinique potentiel dans le traitement de la LLC pour contrer l'effet délétère du légalidomide sur le niveau d'expression membranaire du CXCR4.

Le CAL101 (GS-1101, Idelalisib) est un inhibiteur spécifique de la PI3K δ qui présente une très bonne efficacité thérapeutique dans le traitement des LLC en rechute ou réfractaire [140]. Cette efficacité se traduit par une réduction des adénopathies et une augmentation transitoire de la lymphocytose. Nous avons montré *in vitro* que la diminution du CXCR4 en réponse à la stimulation BCR était totalement inhibé par le CAL 101. Ainsi et sur la base de l'importance de l'expression du CXCR4 pour la sortie des LB du ganglion, nous pouvons proposer que la réduction des adénopathies observée chez les patients de LLC traités par le CAL101 [138] reposerait sur une inhibition de la downrégulation du CXCR4 *in vivo*.

Notre étude a permis d'identifier les PKD comme étant des effecteurs activés par la PI3K et essentiels pour la down-régulation du CXCR4 en réponse au BCR. Il est alors tentant de proposer qu'une inhibition des PKD *in vivo* pourrait entraîner des effets similaires à ceux observés avec le CAL101 *via* une restauration de l'expression du CXCR4. Une étude *in vivo* réalisé chez la souris a montré que l'administration orale d'un inhibiteur de PKD, le CRT0066101 diminue efficacement la croissance du cancer du pancréas [312]. Ces données suggèrent ainsi la possibilité de l'utilisation *in vivo* d'inhibiteurs des PKD. Ces derniers pourraient ainsi être à la base d'un nouveau traitement thérapeutique dans la LLC.

X. Références

1. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 804-15.
2. Soma, L.A., F.E. Craig, and S.H. Swerdlow, *The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*. Hum Pathol, 2006. **37**(2): p. 152-9.
3. Nunez, C., et al., *B cells are generated throughout life in humans*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 866-72.
4. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 290-301.
5. Wasnik, S., et al., *Osteohematopoietic stem cell niches in bone marrow*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 95-133.
6. Arai, F. and T. Suda, *Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 41-53.
7. ter Huurne, M., C.G. Figdor, and R. Torensma, *Hematopoietic stem cells are coordinated by the molecular cues of the endosteal niche*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(8): p. 1131-41.
8. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
9. Nie, Y., Y.C. Han, and Y.R. Zou, *CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 777-83.
10. Hosokawa, K., et al., *Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells*. Blood, 2010. **116**(4): p. 554-63.
11. Li, L., et al., *The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 43-55.
12. Ehninger, A. and A. Trumpp, *The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 421-8.
13. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
14. Ohneda, O., et al., *Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium*. Blood, 1998. **92**(3): p. 908-19.
15. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
16. Spangrude, G.J., et al., *Mouse hematopoietic stem cells*. Blood, 1991. **78**(6): p. 1395-402.
17. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
18. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
19. Hardy, R.R., et al., *Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1213-25.
20. Blom, B. and H. Spits, *Development of human lymphoid cells*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 287-320.
21. Schebesta, M., B. Heavey, and M. Busslinger, *Transcriptional control of B-cell development*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 216-23.
22. Bain, G., et al., *Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage*. Immunity, 1997. **6**(2): p. 145-54.
23. Zhuang, Y., et al., *Functional replacement of the mouse E2A gene with a human HEB cDNA*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(6): p. 3340-9.
24. Busslinger, M., *Transcriptional control of early B cell development*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 55-79.
25. Medina, K.L., et al., *Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate*. Dev Cell, 2004. **7**(4): p. 607-17.

26. Adams, B., et al., *Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis*. *Genes Dev*, 1992. **6**(9): p. 1589-607.
27. Ollila, J. and M. Vihinen, *B cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(3): p. 518-23.
28. Martensson, I.L., et al., *The pre-B cell receptor checkpoint*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(12): p. 2572-9.
29. Seagal, J. and D. Melamed, *Selection events in directing B cell development*. *Histol Histopathol*, 2003. **18**(2): p. 519-27.
30. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. *Nature*, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
31. Melchers, F., et al., *Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells*. *Immunol Rev*, 2000. **175**: p. 33-46.
32. Melchers, F., *Fit for life in the immune system? Surrogate L chain tests H chains that test L chains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 2571-3.
33. von Boehmer, H. and F. Melchers, *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 14-20.
34. Ohnishi, K. and F. Melchers, *The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(9): p. 849-56.
35. Rolink, A.G., et al., *B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells*. *Immunol Lett*, 1999. **68**(1): p. 89-93.
36. Constantinescu, A. and M.S. Schlissel, *Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development*. *J Exp Med*, 1997. **185**(4): p. 609-20.
37. Healy, J.I. and C.C. Goodnow, *Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 645-70.
38. Hartley, S.B., et al., *Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens*. *Nature*, 1991. **353**(6346): p. 765-9.
39. Tiller, T., et al., *Autoreactivity in human IgG+ memory B cells*. *Immunity*, 2007. **26**(2): p. 205-13.
40. Whitlock, C.A. and O.N. Witte, *Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(11): p. 3608-12.
41. Collins, L.S. and K. Dorshkind, *A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis*. *J Immunol*, 1987. **138**(4): p. 1082-7.
42. Nagasawa, T., H. Kikutani, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(6): p. 2305-9.
43. Egawa, T., et al., *The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor*. *Immunity*, 2001. **15**(2): p. 323-34.
44. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. *Immunity*, 1999. **10**(4): p. 463-71.
45. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
46. Dias, S., et al., *Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors*. *J Exp Med*, 2005. **201**(6): p. 971-9.
47. Corcoran, A.E., et al., *Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor*. *Nature*, 1998. **391**(6670): p. 904-7.
48. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine*. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
49. Prieyl, J.A. and T.W. LeBien, *Interleukin 7 independent development of human B cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(19): p. 10348-53.
50. Billips, L.G., et al., *Immunoglobulin recombinase gene activity is modulated reciprocally by interleukin 7 and CD19 in B cell progenitors*. *J Exp Med*, 1995. **182**(4): p. 973-82.
51. Zhu, J., et al., *Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2007. **109**(9): p. 3706-12.

52. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. *Immunity*, 2004. **20**(6): p. 707-18.
53. Funk, P.E., R.P. Stephan, and P.L. Witte, *Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow*. *Blood*, 1995. **86**(7): p. 2661-71.
54. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(2): p. 107-16.
55. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow*. *Nature*, 1997. **388**(6638): p. 133-4.
56. Willard-Mack, C.L., *Normal structure, function, and histology of lymph nodes*. *Toxicol Pathol*, 2006. **34**(5): p. 409-24.
57. Anderson, A.O. and N.D. Anderson, *Studies on the structure and permeability of the microvasculature in normal rat lymph nodes*. *Am J Pathol*, 1975. **80**(3): p. 387-418.
58. Malhotra, D., A.L. Fletcher, and S.J. Turley, *Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity*. *Immunol Rev*, 2013. **251**(1): p. 160-76.
59. Malhotra, D., et al., *Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(5): p. 499-510.
60. Gowans, J.L., *The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat*. *J Physiol*, 1959. **146**(1): p. 54-69.
61. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 360-70.
62. Anderson, N.D., A.O. Anderson, and R.G. Wyllie, *Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues*. *Immunology*, 1976. **31**(3): p. 455-73.
63. Girard, J.P., C. Moussion, and R. Forster, *HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(11): p. 762-73.
64. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
65. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-78.
66. Rosen, S.D., *Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 129-56.
67. Gunn, M.D., et al., *A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(1): p. 258-63.
68. Baekkevold, E.S., et al., *The CCR7 ligand *elc* (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment*. *J Exp Med*, 2001. **193**(9): p. 1105-12.
69. Stein, J.V., et al., *The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules*. *J Exp Med*, 2000. **191**(1): p. 61-76.
70. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. *Cell*, 1999. **99**(1): p. 23-33.
71. Okada, T., et al., *Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches*. *J Exp Med*, 2002. **196**(1): p. 65-75.
72. Bao, X., et al., *Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 817-29.
73. Bajenoff, M., et al., *Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes*. *Immunity*, 2006. **25**(6): p. 989-1001.
74. Gonzalez, S.F., et al., *Trafficking of B cell antigen in lymph nodes*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 215-33.
75. Forkert, P.G., J.A. Thliveris, and F.D. Bertalanffy, *Structure of sinuses in the human lymph node*. *Cell Tissue Res*, 1977. **183**(1): p. 115-30.

76. Kaldjian, E.P., et al., *Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix*. *Int Immunol*, 2001. **13**(10): p. 1243-53.
77. Hayakawa, M., M. Kobayashi, and T. Hoshino, *Direct contact between reticular fibers and migratory cells in the paracortex of mouse lymph nodes: a morphological and quantitative study*. *Arch Histol Cytol*, 1988. **51**(3): p. 233-40.
78. Roozendaal, R., R.E. Mebius, and G. Kraal, *The conduit system of the lymph node*. *Int Immunol*, 2008. **20**(12): p. 1483-7.
79. Worbs, T., et al., *CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo*. *J Exp Med*, 2007. **204**(3): p. 489-95.
80. Pham, T.H., et al., *SIP1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 122-33.
81. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. *Nature*, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
82. Roozendaal, R., et al., *Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles*. *Immunity*, 2009. **30**(2): p. 264-76.
83. Katakai, T., et al., *Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs*. *J Immunol*, 2008. **181**(9): p. 6189-200.
84. Cahalan, M.D. and I. Parker, *Imaging the choreography of lymphocyte trafficking and the immune response*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(4): p. 476-82.
85. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. *Cell*, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
86. Pereira, J.P., et al., *EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle*. *Nature*, 2009. **460**(7259): p. 1122-6.
87. Gatto, D., et al., *Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses*. *Immunity*, 2009. **31**(2): p. 259-69.
88. Breiteneder-Geleff, S., et al., *Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(2): p. 385-94.
89. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(4): p. 789-801.
90. Irjala, H., et al., *Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium*. *J Exp Med*, 2001. **194**(8): p. 1033-42.
91. Forster, R., A. Braun, and T. Worbs, *Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(6): p. 271-80.
92. Grigorova, I.L., et al., *Cortical sinus probing, SIP1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(1): p. 58-65.
93. Ohtani, O. and Y. Ohtani, *Structure and function of rat lymph nodes*. *Arch Histol Cytol*, 2008. **71**(2): p. 69-76.
94. Chiba, K., et al., *FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing*. *J Immunol*, 1998. **160**(10): p. 5037-44.
95. Paugh, S.W., et al., *The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2*. *FEBS Lett*, 2003. **554**(1-2): p. 189-93.
96. Brinkmann, V., et al., *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21453-7.
97. Schwab, S.R., et al., *Lymphocyte sequestration through SIP lyase inhibition and disruption of SIP gradients*. *Science*, 2005. **309**(5741): p. 1735-9.
98. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. *Nature*, 2004. **427**(6972): p. 355-60.

99. Chiba, K., et al., *Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(1): p. 11-9.
100. Sinha, R.K., et al., *B lymphocytes exit lymph nodes through cortical lymphatic sinusoids by a mechanism independent of sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 434-46.
101. Lo, C.G., et al., *Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 291-301.
102. Park, C., et al., *Lymph node B lymphocyte trafficking is constrained by anatomy and highly dependent upon chemoattractant desensitization*. Blood, 2012. **119**(4): p. 978-89.
103. Schmidt, T.H., et al., *CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches*. J Exp Med, 2013. **210**(6): p. 1099-107.
104. Pape, K.A., et al., *The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 491-502.
105. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *The antigen expressway: follicular conduits carry antigen to B cells*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 177-9.
106. Carrasco, Y.R. and F.D. Batista, *B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 286-91.
107. Depoil, D., et al., *CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 63-72.
108. Kurosaki, T. and M. Hikida, *Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 132-48.
109. Stepanek, O., et al., *Nonredundant roles of Src-family kinases and Syk in the initiation of B-cell antigen receptor signaling*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1807-18.
110. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *New insights into the early molecular events underlying B cell activation*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 609-19.
111. Pierce, S.K., *Lipid rafts and B-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 96-105.
112. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
113. Arana, E., et al., *Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 88-99.
114. Dal Porto, J.M., et al., *B cell antigen receptor signaling 101*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 599-613.
115. Crabtree, G.R. and E.N. Olson, *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S67-79.
116. Guo, B., T.T. Su, and D.J. Rawlings, *Protein kinase C family functions in B-cell activation*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 367-73.
117. Kang, S.W., et al., *PKCbeta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5692-702.
118. Krappmann, D., et al., *B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(19): p. 6640-50.
119. Poe, J.C., M. Hasegawa, and T.F. Tedder, *CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(6): p. 739-62.
120. Srinivasan, L., et al., *PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival*. Cell, 2009. **139**(3): p. 573-86.
121. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-9.
122. Hardtke, S., L. Ohl, and R. Forster, *Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help*. Blood, 2005. **106**(6): p. 1924-31.
123. MacLennan, I.C., *Somatic mutation. From the dark zone to the light*. Curr Biol, 1994. **4**(1): p. 70-2.

124. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 853-65.
125. Gatto, D. and R. Brink, *The germinal center reaction*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(5): p. 898-907; quiz 908-9.
126. Allen, C.D., et al., *Imaging of germinal center selection events during affinity maturation*. Science, 2007. **315**(5811): p. 528-31.
127. Allen, C.D., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-52.
128. Chan, T.D., et al., *Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3139-49.
129. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 45-56.
130. Cyster, J.G., *Homing of antibody secreting cells*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 48-60.
131. Andreeff, M., et al., *Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA*. Blood, 1980. **55**(2): p. 282-93.
132. Hanada, M., et al., *bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1993. **82**(6): p. 1820-8.
133. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
134. Gottardi, D., et al., *In leukaemic CD5+ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis*. Br J Haematol, 1996. **94**(4): p. 612-8.
135. Damle, R.N., et al., *Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations*. Blood, 2004. **103**(2): p. 375-82.
136. Messmer, B.T., et al., *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 755-64.
137. Granziero, L., et al., *Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2777-83.
138. Herishanu, Y., et al., *Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications*. Hematol Oncol Clin North Am, 2013. **27**(2): p. 173-206.
139. Lagneaux, L., et al., *Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells*. Blood, 1998. **91**(7): p. 2387-96.
140. Burger, J.A. and J.G. Gribben, *The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies*. Semin Cancer Biol, 2013.
141. de la Fuente, M.T., et al., *Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 495-502.
142. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
143. Tsukada, N., et al., *Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1030-7.
144. Burkle, A., et al., *Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3316-25.
145. Nishio, M., et al., *Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1012-20.
146. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.

147. Patten, P.E., et al., *CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment*. *Blood*, 2008. **111**(10): p. 5173-81.
148. Deaglio, S., et al., *CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells*. *Mol Med*, 2010. **16**(3-4): p. 87-91.
149. Burger, J.A., et al., *High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation*. *Blood*, 2009. **113**(13): p. 3050-8.
150. Ponader, S., et al., *The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo*. *Blood*, 2012. **119**(5): p. 1182-9.
151. Hoellenriegel, J., et al., *The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2011. **118**(13): p. 3603-12.
152. Bagnara, D., et al., *A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease*. *Blood*, 2011. **117**(20): p. 5463-72.
153. Fluckiger, A.C., et al., *Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors*. *Blood*, 1992. **80**(12): p. 3173-81.
154. Furman, R.R., et al., *Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells*. *J Immunol*, 2000. **164**(4): p. 2200-6.
155. Ghia, P., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(5): p. 1403-13.
156. Chilosi, M., et al., *Immunohistochemical demonstration of follicular dendritic cells in bone marrow involvement of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer*, 1985. **56**(2): p. 328-32.
157. Ghia, P., et al., *Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **294**: p. 135-45.
158. Mohle, R., et al., *Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)*. *Leukemia*, 1999. **13**(12): p. 1954-9.
159. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3658-67.
160. Barretina, J., et al., *CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease*. *Ann Hematol*, 2003. **82**(8): p. 500-5.
161. Lopez-Giral, S., et al., *Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(2): p. 462-71.
162. Trentin, L., et al., *Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas*. *Blood*, 2004. **104**(2): p. 502-8.
163. Ticchioni, M., et al., *Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a*. *Oncogene*, 2007. **26**(50): p. 7081-91.
164. Ghobrial, I.M., et al., *Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma*. *Mayo Clin Proc*, 2004. **79**(3): p. 318-25.
165. Till, K.J., et al., *The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes*. *Blood*, 2002. **99**(8): p. 2977-84.
166. Redondo-Munoz, J., et al., *MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration*. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 3143-51.
167. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Leuk Lymphoma*, 2002. **43**(3): p. 461-6.
168. Kumar, C.C., *Signaling by integrin receptors*. *Oncogene*, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1365-73.

169. Burger, J.A., et al., *Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism*. J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 305-15.
170. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. Blood, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
171. Herishanu, Y., et al., *The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **117**(2): p. 563-74.
172. Hashimoto, S., et al., *Clonal heterogeneity in membrane expression of CD5 in a patient with chronic lymphocytic leukemia*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **764**: p. 482-4.
173. Hashimoto, S., N. Chiorazzi, and P.K. Gregersen, *Alternative splicing of CD79a (Ig-alpha/mb-1) and CD79b (Ig-beta/B29) RNA transcripts in human B cells*. Mol Immunol, 1995. **32**(9): p. 651-9.
174. Alfarano, A., et al., *An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2327-35.
175. Thompson, A.A., et al., *Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1387-94.
176. Payelle-Brogard, B., et al., *Analysis of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in familial chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3516-22.
177. Payelle-Brogard, B., et al., *Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2002. **118**(4): p. 976-85.
178. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
179. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 841-94.
180. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4389-95.
181. Kohler, F., et al., *Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 912-21.
182. Borche, L., et al., *Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies*. Blood, 1990. **76**(3): p. 562-9.
183. Sthoeger, Z.M., et al., *Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 1989. **169**(1): p. 255-68.
184. Herve, M., et al., *Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1636-43.
185. Fais, F., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors*. J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1515-25.
186. Widhopf, G.F., 2nd, et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2499-504.
187. Ghiotto, F., et al., *Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 1008-16.
188. Stamatopoulos, K., et al., *Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations*. Blood, 2007. **109**(1): p. 259-70.
189. Agathangelidis, A., et al., *Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies*. Blood, 2012. **119**(19): p. 4467-75.
190. Klein, U., et al., *Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1625-38.
191. Binder, M., et al., *Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15992.

192. Chu, C.C., et al., *Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin.* Blood, 2010. **115**(19): p. 3907-15.
193. Lanemo Myhrinder, A., et al., *A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies.* Blood, 2008. **111**(7): p. 3838-48.
194. Duhren-von Minden, M., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling.* Nature, 2012. **489**(7415): p. 309-12.
195. Michel, F., et al., *Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx.* J Immunol, 1993. **150**(8 Pt 1): p. 3624-33.
196. Lankester, A.C., et al., *Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells.* Blood, 1995. **86**(3): p. 1090-7.
197. Zupo, S., et al., *CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis.* Blood, 1996. **88**(4): p. 1365-74.
198. Lanham, S., et al., *Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2003. **101**(3): p. 1087-93.
199. Deglesne, P.A., et al., *Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression.* Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7158-66.
200. Le Roy, C., et al., *The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2012. **120**(2): p. 356-65.
201. Gobessi, S., et al., *Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells.* Leukemia, 2009. **23**(4): p. 686-97.
202. Song, Z., et al., *Activities of SYK and PLCgamma2 predict apoptotic response of CLL cells to SRC tyrosine kinase inhibitor dasatinib.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 587-99.
203. Petlickovski, A., et al., *Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells.* Blood, 2005. **105**(12): p. 4820-7.
204. Ringshausen, I., et al., *Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta.* Blood, 2002. **100**(10): p. 3741-8.
205. Abrams, S.T., et al., *B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase CbetaII.* Blood, 2007. **109**(3): p. 1193-201.
206. Alkan, S., et al., *Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition.* Am J Hematol, 2005. **79**(2): p. 97-106.
207. Thomas, A., et al., *Bryostatins induces protein kinase C modulation, Mcl-1 up-regulation and phosphorylation of Bcl-2 resulting in cellular differentiation and resistance to drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.* Leuk Lymphoma, 2004. **45**(5): p. 997-1008.
208. Ringshausen, I., et al., *Mechanisms of apoptosis-induction by rottlerin: therapeutic implications for B-CLL.* Leukemia, 2006. **20**(3): p. 514-20.
209. Barragan, M., et al., *Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1473-9.
210. Rodriguez, A., et al., *Variability in the degree of expression of phosphorylated I{kappa}B{alpha} in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6796-806.
211. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia.* J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.

212. Wiestner, A., et al., *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4944-51.
213. Crespo, M., et al., *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(18): p. 1764-75.
214. Chen, L., et al., *Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(13): p. 4609-14.
215. Chen, L., et al., *ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2005. **105**(5): p. 2036-41.
216. Castro, J.E., et al., *ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2506-12.
217. Chen, L., et al., *ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2685-92.
218. Dalloul, A., *CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells*. *Autoimmun Rev*, 2009. **8**(4): p. 349-53.
219. Hippen, K.L., L.E. Tze, and T.W. Behrens, *CD5 maintains tolerance in anergic B cells*. *J Exp Med*, 2000. **191**(5): p. 883-90.
220. Gary-Gouy, H., et al., *CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 232-9.
221. Hillion, S., et al., *Expression of RAGs in peripheral B cells outside germinal centers is associated with the expression of CD5*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5553-61.
222. Malavasi, F., et al., *Human CD38: a glycoprotein in search of a function*. *Immunol Today*, 1994. **15**(3): p. 95-7.
223. Deaglio, S., K. Mehta, and F. Malavasi, *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors*. *Leuk Res*, 2001. **25**(1): p. 1-12.
224. Malavasi, F., et al., *CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later*. *Blood*, 2011. **118**(13): p. 3470-8.
225. Damle, R.N., et al., *CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3352-9.
226. Hallek, M. and N. Pflug, *State of the art treatment of chronic lymphocytic leukaemia*. *Blood Rev*, 2011. **25**(1): p. 1-9.
227. Contri, A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 369-78.
228. Hantschel, O., et al., *The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(33): p. 13283-8.
229. ten Hacken, E., et al., *Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2013. **121**(12): p. 2264-73.
230. Veldurthy, A., et al., *The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1443-52.
231. Amrein, P.C., et al., *Phase II study of dasatinib in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(9): p. 2977-86.
232. Buchner, M., et al., *Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2010. **115**(22): p. 4497-506.
233. Buchner, M., et al., *Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer Res*, 2009. **69**(13): p. 5424-32.
234. Quiroga, M.P., et al., *B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 1029-37.

235. Suljagic, M., et al., *The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the Emu- TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4894-905.
236. Herman, S.E., et al., *Fostamatinib inhibits B-cell receptor signaling, cellular activation and tumor proliferation in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2013. **27**(8): p. 1769-73.
237. Herman, S.E., et al., *Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6287-96.
238. de Rooij, M.F., et al., *The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2012. **119**(11): p. 2590-4.
239. Byrd, J.C., et al., *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2013. **369**(1): p. 32-42.
240. Herman, S.E., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2078-88.
241. Schulz, A., et al., *Lenalidomide reduces survival of chronic lymphocytic leukemia cells in primary cocultures by altering the myeloid microenvironment*. Blood, 2013. **121**(13): p. 2503-11.
242. Ramsay, A.G., et al., *Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2427-37.
243. Ramsay, A.G. and J.G. Gribben, *Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug*. Haematologica, 2009. **94**(9): p. 1198-202.
244. Aue, G., et al., *Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2009. **94**(9): p. 1266-73.
245. Herman, S.E., et al., *The role of phosphatidylinositol 3-kinase-delta in the immunomodulatory effects of lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4323-7.
246. Andritsos, L.A., et al., *Higher doses of lenalidomide are associated with unacceptable toxicity including life-threatening tumor flare in patients with chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2008. **26**(15): p. 2519-25.
247. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
248. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
249. Chabot, D.J., et al., *N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4404-13.
250. Wang, J., et al., *N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins*. Virology, 2004. **324**(1): p. 140-50.
251. Farzan, M., et al., *The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29484-9.
252. Alkhatib, G., *The biology of CCR5 and CXCR4*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 96-103.
253. Cojoc, M., et al., *Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis*. Onco Targets Ther, 2013. **6**: p. 1347-1361.
254. Krupnick, J.G. and J.L. Benovic, *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 289-319.
255. Fong, A.M., et al., *Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7478-83.
256. Signoret, N., et al., *Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4*. J Cell Biol, 1997. **139**(3): p. 651-64.

257. Haribabu, B., et al., *Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization.* J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28726-31.
258. Orsini, M.J., et al., *Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization.* J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 31076-86.
259. Woerner, B.M., et al., *Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies.* Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11392-9.
260. Signoret, N., et al., *Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis.* J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 18): p. 2819-30.
261. Peacock, J.W. and F.R. Jirik, *TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR.* J Immunol, 1999. **162**(1): p. 215-23.
262. Guinamard, R., et al., *B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4.* J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1461-6.
263. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
264. Marchese, A., et al., *The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking.* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(7): p. 369-76.
265. Tarasova, N.I., R.H. Stauber, and C.J. Michejda, *Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXCR4 chemokine receptor 4.* J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 15883-6.
266. Marchese, A. and J.L. Benovic, *Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting.* J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45509-12.
267. Johannes, F.J., et al., *PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family.* J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 6140-8.
268. Valverde, A.M., et al., *Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8572-6.
269. Sturany, S., et al., *Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases.* J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3310-8.
270. Hayashi, A., et al., *PKC ν , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ .* Biochim Biophys Acta, 1999. **1450**(1): p. 99-106.
271. Wang, Q.J., *PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling.* Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(6): p. 317-23.
272. Iglesias, T. and E. Rozengurt, *Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs.* FEBS Lett, 1999. **454**(1-2): p. 53-6.
273. Iglesias, T. and E. Rozengurt, *Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain.* J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 410-6.
274. Van Lint, J.V., J. Sinnott-Smith, and E. Rozengurt, *Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase.* J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1455-61.
275. Johannes, F.J., et al., *Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C μ .* Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 303-7.
276. Zugaza, J.L., et al., *Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway.* EMBO J, 1996. **15**(22): p. 6220-30.
277. Waldron, R.T., T. Iglesias, and E. Rozengurt, *The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the ϵ isoform of protein kinase C.* J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9224-30.
278. Iglesias, T., R.T. Waldron, and E. Rozengurt, *Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation.* J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27662-7.
279. Fu, Y. and C.S. Rubin, *Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology.* EMBO Rep, 2011. **12**(8): p. 785-96.

280. Nishikawa, K., et al., *Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 952-60.
281. Sidorenko, S.P., et al., *Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling*. Immunity, 1996. **5**(4): p. 353-63.
282. Jacamo, R., et al., *Sequential protein kinase C (PKC)-dependent and PKC-independent protein kinase D catalytic activation via Gq-coupled receptors: differential regulation of activation loop Ser(744) and Ser(748) phosphorylation*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12877-87.
283. Sinnott-Smith, J., et al., *Protein kinase D mediates mitogenic signaling by Gq-coupled receptors through protein kinase C-independent regulation of activation loop Ser744 and Ser748 phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13434-45.
284. Matthews, S.A., E. Rozengurt, and D. Cantrell, *Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu*. J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26543-9.
285. Rey, O. and E. Rozengurt, *Protein kinase D interacts with Golgi via its cysteine-rich domain*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(1): p. 21-6.
286. Matthews, S.A., et al., *Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD)*. EMBO J, 2000. **19**(12): p. 2935-45.
287. Matthews, S., et al., *Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation*. FEBS Lett, 1999. **457**(3): p. 515-21.
288. Rey, O., et al., *Protein kinase C nu/protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23773-85.
289. Rozengurt, E., O. Rey, and R.T. Waldron, *Protein kinase D signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13205-8.
290. Peterburs, P., et al., *Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5634-8.
291. Jaggi, M., et al., *E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 483-92.
292. Jaggi, M., et al., *Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer*. Urol Oncol, 2005. **23**(6): p. 402-6.
293. Jaggi, M., et al., *Protein kinase C mu is down-regulated in androgen-independent prostate cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 254-60.
294. Du, C., et al., *Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7810-9.
295. Hausser, A., et al., *Protein kinase C mu selectively activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p42 pathway*. FEBS Lett, 2001. **492**(1-2): p. 39-44.
296. Wang, Y., et al., *The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 916-26.
297. Kisfalvi, K., et al., *Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells*. J Cell Physiol, 2010. **223**(2): p. 309-16.
298. Matthews, S.A., et al., *Regulation of protein kinase Cnu by the B-cell antigen receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9086-91.
299. Matthews, S.A., et al., *Unique functions for protein kinase D1 and protein kinase D2 in mammalian cells*. Biochem J, 2010. **432**(1): p. 153-63.
300. Johannes, F.J., et al., *Bruton's tyrosine kinase (Btk) associates with protein kinase C mu*. FEBS Lett, 1999. **461**(1-2): p. 68-72.
301. Vigorito, E., D. Kovetski, and M. Turner, *Synergistic activation of PKD by the B cell antigen receptor and CD19 requires PI3K, Vav1 and PLCgamma*. Cell Signal, 2006. **18**(9): p. 1455-60.

302. Pracht, C., et al., *Association of protein kinase C-delta with the B cell antigen receptor complex*. Cell Signal, 2007. **19**(4): p. 715-22.
303. Wood, C.D., U. Marklund, and D.A. Cantrell, *Dual phospholipase C/diacylglycerol requirement for protein kinase D1 activation in lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 6245-51.
304. Stamatopoulos, B., et al., *Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA*. Haematologica, 2009. **94**(6): p. 790-9.
305. Jung, T.M., et al., *Down-regulation of homing receptors after T cell activation*. J Immunol, 1988. **141**(12): p. 4110-7.
306. Galkina, E., et al., *L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes*. J Exp Med, 2003. **198**(9): p. 1323-35.
307. Nedellec, S., et al., *B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3749-56.
308. Vlad, A., et al., *Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease*. Cancer Res, 2009. **69**(16): p. 6387-95.
309. Kovalevska, L.M., et al., *Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas*. Exp Oncol, 2006. **28**(3): p. 225-30.
310. Sharlow, E.R., et al., *Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinolone*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33516-26.
311. Zhang, H., et al., *Protein kinase D activation stimulates the transcription of the insulin receptor gene*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **330**(1-2): p. 25-32.
312. Harikumar, K.B., et al., *A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(5): p. 1136-46.

Implication des PKD dans la downrégulation du CXCR4 en réponse à la stimulation du BCR des LB de Leucémie Lymphoïde Chronique.

L'évolutivité de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) se caractérise par la présence d'adénopathie résultant d'une accumulation de lymphocytes B (LB) pathologiques au sein du microenvironnement ganglionnaire. La stimulation antigénique joue un rôle important dans le trafic intra-ganglionnaire des LB suggérant qu'elle puisse jouer un rôle dans la rétention/accumulation des LB pathologiques au sein des ganglions. Dans ce contexte nous avons étudié l'impact *in vitro* de la stimulation antigénique des cellules de LLC sur l'expression d'effecteurs clés du trafic ganglionnaire des LB.

Nous avons d'abord montré que la stimulation du récepteur B à l'antigène (BCR) entraîne une diminution de l'expression membranaire du CXCR4 et du CD62L associée à une diminution de la migration et de l'adhésion *in vitro* des LB de LLC. De plus, l'intensité de la down-régulation du CXCR4 et du CD62L en réponse à la stimulation du BCR est associée à des marqueurs de mauvais pronostic et corrélé à la survie sans progression des patients LLC.

Nous avons ensuite analysé les voies de signalisation activées en aval du BCR et impliquées dans l'internalisation du CXCR4 dans les LB de LLC. L'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K (LY294002, CAL101) et des protéines kinases D (Gö6976, CID755673) entraîne une inhibition complète de la down-régulation du CXCR4 dépendante de la stimulation du BCR, révélant un rôle de ces kinases dans ce processus. D'un point de vue fonctionnel, la stimulation du BCR induit une phosphorylation/activation des PKD2 et/ou PKD3 de manière dépendante de la PI3K et le taux d'induction de la phosphorylation des PKD2/3 est corrélé à l'intensité de down-régulation du CXCR4. Enfin, l'activation du BCR induit une phosphorylation du CXCR4 sur des résidus impliqués dans l'internalisation du récepteur, suggérant que ce processus d'endocytose est en partie placé sous le contrôle des PKD.

En conclusion, nos résultats ont permis de mettre en évidence une implication de la PI3K et des PKD dans la down-régulation du CXCR4 membranaire en réponse à une activation du BCR. Ces données suggèrent que ces protéines pourraient jouer *in vivo* un rôle dans la perturbation du trafic ganglionnaire des LB de LLC en réponse à la stimulation antigénique.

Chronic Lymphocytic Leukaemia microenvironment: B-cell receptor stimulation and modulation of CXCR4 membrane expression by protein kinase D.

Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) progression involves enlargement of lymph nodes due to an accumulation of CLL B cells into the nodal microenvironment. The crucial role of the antigenic stimulation through the B cell receptor (BCR) in normal B cell trafficking into the lymph nodes suggests that BCR engagement might be implicated in the CLL B cell retention/accumulation into the lymphatic compartment. In this context, we focused our efforts on the study of the impact of an *in vitro* antigenic stimulation on the expression of key effectors involved in CLL B trafficking.

First, we demonstrated that BCR stimulation decreased CXCR4- and CD62L-membrane expressions; this decrease was associated to an *in vitro* reduction of CLL B cell migration and adhesion. Moreover, the intensity of CXCR4- and CD62L- down-regulation upon BCR stimulation was linked to unfavourable prognostic markers and correlated to CLL patients' progression free survival.

Next, we analysed the activated BCR signalling cascades that were involved in CXCR4 internalization of CLL B cells. The LY294002/CAL101-PI3K and Gö6976/CID755673-PKD inhibitors blocked BCR-dependent CXCR4 down-regulation, revealing the role of the PKDs in this process. Functionally, BCR triggering induced PKD2/3 phosphorylation/activation in a PI3K-dependent manner. Interestingly, the level of the phospho-PKD2/3 induction was correlated to the intensity of BCR-dependent CXCR4 down-regulation. Furthermore, BCR engagement allowed CXCR4 phosphorylation on specific residues involved in its internalization, suggesting that CXCR4 endocytic process was partially regulated by PKDs.

Altogether, our results demonstrated the PI3K and PKD implications on cell surface CXCR4 down-regulation in response to BCR stimulation. These data proposed that PI3K and PKDs could play a role in the altered lymphatic trafficking of CLL B cells upon BCR engagement.

Mots-clés : LLC, LB, Microenvironnement, Ganglion, BCR, CXCR4, CD62L, PI3K, PKD

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

UMR U978 Inserm-Université Paris 13, UFR SMBH-74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny