

UNIVERSITE PARIS 13 NORD
UFR de SANTE, MEDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

ECOLE DOCTORALE GALILEE
N° attribué par la bibliothèque



THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13
Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présenté et soutenue publiquement par
Rim ZAABOUB
Le 03 Avril 2019

Implication des Nurse Like Cell exprimant le CCL21 dans le microenvironnement ganglionnaire de la leucémie lymphoïde chronique

Directeur de thèse : Pr Antoine Martin
Co-directeur de thèse : Dr Elisabetta Dondi

Membres du jury :

Président du jury : Dr Emmanuel Donnadiou
Rapporteur : Pr Andres Alcover
Rapporteur : Pr Loïc Ysebaert
Examineur : Dr Valérie Besnard
Examineur : Dr Thierry Fest
Directeur de thèse : Pr Antoine Martin
Co-directeur de thèse : Dr Elisabetta Dondi

Remerciements

Ce manuscrit vient clore une expérience enrichissante aussi bien d'un point de vue professionnel qu'humain. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont cru en moi et m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Professeur Thierry Fest, le Professeur Loic Ysebaert, le Docteur Valerie Besnard et le Docteur Emmanuel Donnadiou d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer ce travail.

Je remercie le Dr. Nadine Varin-Blank de m'avoir accueillie dans ton laboratoire, superviser mes travaux, de m'avoir également encourager au moments les plus difficiles et plus généralement, pour prendre le temps de faire régner une ambiance de travaille solidaire et sympathique en plus de tes autres responsabilités en qualité de directeur de recherche.

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement le Pr. Antoine Martin pour m'avoir fait confiance sur ce projet lors de mon stage de M1 et pour avoir persévéré à mes côtés en thèse, et d'avoir cru en moi de début a la fin. J'ai apprécié à la fois sa rigueur scientifique et sa tolérance face à mes idées, quelles qu'elles soient, qu'il m'a laissé exprimer tant sur le plan théorique que sur le plan pratique. J'ai apprécié ses encouragements pour aller présenter mes travaux en congrès. C'est un homme que j'estime pour son honnêteté et son humanisme. Je suis fière qu'il soit, à terme, mon directeur de thèse.

J'exprime ici toute ma reconnaissances a Dr Elisabetta Dondi, pour non seulement ses remarques attentives et constructives mais aussi pour son savoir faire technique et sa rigueur scientifique qu'elle a essayer de me les transmettre. J'ai beaucoup apprécié sa remarquable disponibilité, son investissement et son accompagnement tout au long de ces trois années.

Je porte également une attention toute particulière à l'équipe "LLC", à commencer par les Pr. Florence Cymbalista et Vincent Levy (Hôpital Avicenne, Bobigny) qui nous ont procuré les échantillons de sang issus de patients atteints de Leucémie Lymphoïde

Chronique. Un grand merci Christine le Roy, Stéphanie Le Coquil, Laure Aubard pour les moments drôles partagé autours des réunions LLC.

Je remercie tous les doctorants du laboratoire : Rofia qui a été, entre autres, une agréable et intéressante partenaire de paillasse et avant tout une amie, Souheil pour toutes les dicussions scientifiques qu'on a pu partager.

Je porte une mention particulière à Koceila Ait Belkacem, collègue de bureau mais avant tout ami dans la vie. J'ai adoré partager les bons moments de ce bout de carrière avec toi et je te remercie de m'avoir soutenue dans les moments les plus délicats, ami au grand cœur, plein de bonne humeur et sur qui j'ai toujours pu compter.

De manière générale, je remercie tous les membres de l'unité U978 pour nos échanges enrichissants : Myriam, Antonin, Olivier, Emanuelle, Fanny, Lionel, Dominique, Denis, laura, Bela et tous ceux que j'ai déjà ou que je n'ai pas cité

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres de la plateforme d'imagerie de l'institut Cochin en particulier au Dr. Beatrice Dural, qui m'ont donné accès à différents super outils techniques. Je tiens à vous remercier également Vincent Contremoulins, plateforme d'imagerie Jaque monod pour votre accueil, votre aide et votre sympathie.

Je porte une autre attention toute particulière toute l'équipe de service d'anapathologie, merci aux techniciennes, médecins et la cadre de service.

Un grand merci a tous les membres de Matrice Roche, et particulièrement au membres de Welcomedoctors, mes futures associés : Clément et Remi, merci pour vos encouragements et votre compréhension de mon absence ces deux derniers mois.

Ces travaux n'auraient pas pu être menés à bien sans financement. C'est pourquoi j'aimerais remercier l'Ecole Doctorale de l'Université Paris 13 de m'avoir octroyé un contrat doctoral (3ans) ainsi que la société française d'hématologie de m'avoir accordé un financement de fin de thèse (6 mois).

Je tiens a remercier mes amis : Sabrina, Nesrine, Momo, Ramy, Jiji, Khaoula, et Nounou pour votre présence et encouragements

Je porte une autre attention toute particulière à mes proches en dehors du cadre professionnel, à commencer par la flamme de mon cœur, Mama, Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études malgré la distance tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. Merci Tamtam.

Je te remercie Papa, je te remercie d'avoir su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Tes sacrifices, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Je prête une délicate attention a mes frère set sœurs : Lilia, Poupou, Sara et Kenzi sans qui je ne serai pas ce que je suis. Je m'excuse de ne pas toujours avoir été très présente ces dernières années mais je vous remercie chaleureusement pour votre compréhension, votre soutien et le réconfort que vous m'avez toujours apporté.

Merci a mes chers neveux et nièces : Fadi, Youcef, Yanelle, Rassime et surtout a la petite Rym qui a réussi a me redonner le sourire chaque soir.

Aux patients, qui donnent littéralement un peu d'eux pour la recherche.

Je ne pourrais pas citer tout le monde mais je remercie tous ceux qui m'ont toujours épaulé et encouragé, tous ceux qui ont participé à mon équilibre.

Liste des matières

Remerciments

Table des matières

Abbreviations

Introduction

I. La leucémie lymphoïde chronique

1. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique

Déficiences des processus apoptotiques

Prolifération

2. Les ganglions lymphatiques

Architecture du ganglion

3. Trafic ganglionnaire

4. Altérations du microenvironnement dans la LLC

5. Altération du trafic dans les tissus lymphoïdes dans la LLC

6. Modèles d'études du microenvironnement de la LLC

II. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

1. Les macrophages

Les macrophages de types M1

Les macrophages de types M2

2. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Différenciation

Recrutement

Rôle dans l'immunosuppression

3. Les Nurse-like Cells (NLC, cellules chaperonnes)

Fonctions des NLC

Trafic des cellules dans les niches ganglionnaires

Inhibition de la réponse immunitaire

Recrutement et différenciation

Trafic des cellules dans les niches ganglionnaires

Objétif de la thèse

Résultats

I. Article : Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells are an alternative source of CCL21 homeostatic chemokine in disorganized lymph nodes

II. Résultats supplémentaires

- 1. Cartographie des ganglions de LLC**
- 2. Expression du CCR7 par les lymphocytes B de LLC**
- 3. Expression de CCL21 par les NLC**

Discussion et perspectives

Références bibliographique

Liste des figures

Figure 1 : Les cinq aires lymphoïdes palpables

Figure 2 : Structure d'un ganglion lymphatique

Figure 3 : Centre germinatif

Figure 4 : Etapes d'entrée des lymphocytes dans le ganglion

Figure 5 : Trafic cortical des lymphocytes B

Figure 6 : Gradient des chimiokines créé par les cellules stromales responsables de la migration ganglionnaire

Figure 7 : Dialogue entre la cellule leucémique et la MSC

Figure 8 : Dialogue entre cellules B de LLC et cellules T

Figure 9 : Le microenvironnement tumoral de la LLC

Figure 10 : Phénotype des Macrophages selon leur polarisation

Figure 11 : Représentation schématique de la polarisation des macrophages en macrophages M1

Figure 12 : Polarisation et propriétés fonctionnelles de différentes populations des macrophages

Figure 13 : Mécanisme de recrutement des monocytes au sein des tumeurs

Figure 14 : Fonctions des TAM : rôles pro tumoraux

Figure 15 : Les macrophages favorisent les métastases

Figure 16 : Modèle de recrutement des monocytes dans les ganglions de LLC

Figure 17 : NLC sont les TAM de LLC

Figure 18 : Immunomarquage à l'anticorps anti-CD23 sur des coupes ganglionnaires

Figure 19 : Expression de CCR7 par les lymphocytes B de LLC

Figure 20 : Expression de CCR7 par les lymphocytes B de LLC

Figure 21: Différenciation in vitro de NLCs

Figure 22 : Principe de la technique RNA Primeflow

Figure 23 : Détection de l'ARNm de CXCL13 et CCL21 dans la lignée cellulaire MDA-MB231

Figure 24 : Les macrophages CD68⁺ expriment le CCL21

Figure 25 : Les cellules en suspension n'expriment pas le CCL21

Figure 26 : Immunomarquage à l'anticorps CD163 sur une coupe de ganglion d'un sujet sain et d'un patient atteint de LLC

Figure 27 : Coupe de ganglion inflammatoire

Figure 28 : Tissus non tumoraux marqués par l'anticorps anti-CCR7

Figure 29 : Coloration HES et immunomarquages anti CCR7 des co-cultures des lymphocytes avec les cellules stromales

Liste des tableaux

Tableau 1 : Score de Matutes

Tableau 2 : Classification des stades de Binet

Tableau 3 : Classification de Rai

Tableau 4: Sous-populations stromales dans les organes
lymphoïdes secondaires

Liste des abréviations

µl : micro litre

α-SMA : Actine du muscle lisse alpha

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : AK Transforming

AMD3100 : CXCR4 chemokine receptor agonist

ANG : Angiopoëitine

APRIL : A proliferating-inducing ligand

ARN : Acide ribonucléique

ATM : Ataxia telenfiectasia mutated

BAFF : B cell activating factor

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma extra-large

Bcl-xl : B-cell lymphoma-extra large

Bcl-xs : B-cell lymphoma

BCMA : B cells maturation antigen

BCR : B-cell receptor

BMSC : Bone marrow stromal cell

BTK : Bruton's tyrosine kinase

CCL21 : Chemokine (C-C motif) ligand 21

CCL3 : Chemokine (C-C motif) ligand 3

CCL4 : Chemokine (C-C motif) ligand 4

CCR7 : (C-C motif) receptor 7

CD : Cluster de différenciation

CD40L : Cluster de différenciation 40 ligand

CG : Centre germinatif

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CO : monoxyde de carbone

CSF-1 : Colony stimulating factor 1

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

CXCL12 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 12

CXCL13 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 13

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
CXCR5 : C-X-C chemokine receptor type 5
DLEU2 : Deleted in lymphocytic leukemia 2
DZ : Zone sombre
EBI2 : External bus interface 2
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
Fc : Fragment cristallisable
FDC : Cellules dendritiques folliculaire
FMC7 : Flinders Medical Centre
FRC : Cellule réticulaire fibroblastiques
GAG : glycosaminoglycanes
Hb : hémoglobine
HGF :Hepatocyte growth factor
HMGB1 : Soluble high mobility group box 1
Hp : Haptoglobine
ICAM1 : intracellulaira adhesion molecule 1
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN δ : Interféron gamma
Ig : Immunoglobuline
IgA : Immunoglobuline A
IgD : Immunoglobuline D
IgE : immunoglobuline E
IgG : Immunoglobuline G
IGHV : Chaines lourdes des immunoglobulines
IgM : Immunoglobuline M
IL : Interleukine
IRF5 : interferon regulatory factor 5
L : Litre
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LPS : Lipopolysaccharides
LT : Lymphocyte T
LZ : Zone claire

M1 : Macrophage de type 1
M2 : Macrophage de type 2
MAdCAM1 : mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
MAMs : macrophage associés à des metastase
Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF : monocyte colony-stimulating factor
MDM2 : Mouse double minute 2 homolog
MDR : region minimale délétée
MEC : Matrice extracellulaire
mg : milligramme
miR : micro ARN
mm³ : millimètre cube
Mo : monocyte
MSC : cellules stromales mésenchymateuses
Myc : Myelocytomatosis
NFkB : Nuclear factor-kappa B
NK : Natural killer
NL : Noeud lymphatique
NLC : Nurse Like cell
NZB : New zealand Black
NZW : New Zealand Black
PB : Sang périphérique
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
PD1 : programmed cell death 1
PDL1 : programmed cell death 1 ligand
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
RAGE : Receptor for advanced glycation and products
RAGE : receptor for advanced glycation
RPL13 : Ribosomal protein L13
RT-PCR : Retro transcriptase polymerase chain reaction
S1P : Sphingosine 1 phosphate
S1PR2 : Sphingosine 1 phosphate receptor 2

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SLAMF7 : Signaling lymphocytic activation molecule F7
STAT1 : Signal transducer and activator of transcription 1
TACI : Transmembrane activator and CAML interactor
TAM : macrophages associés aux tumeurs
TCL1 : T-cell leukemia/lymphoma 1
TCR : T cell receptor
TGF- β : Transforming growth factor
Th : Lymphocytes T helper
TIE2 : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
TLR : Toll like receptor
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TP53: Tumor protein 53
VCAM1 : Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VHE : Veinule à endothélium haut
VLA-4 : Very late antigen-4
ZAP70 : Zeta chain associated protein of 70 kDa

Introduction

I. La leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC)/lymphome lymphocytaire est une hémopathie lymphoïde caractérisée par l'accumulation dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) de petits lymphocytes B matures co-exprimant en particulier CD19, CD5 et CD23 (1). La forme leucémique se caractérise par une augmentation du nombre de lymphocytes dans le sang périphérique \geq à $5 \times 10^9/L$. La forme lymphomateuse se traduit par une atteinte ganglionnaire, splénique, voire d'autres cibles extra médullaires.

L'évolution clinique de cette hémopathie est variable. Certains patients présentent une forme indolente avec une espérance de vie proche de la normale ne nécessitant pas de traitement tandis que d'autres développent une forme progressive qui nécessite la mise en place d'un traitement spécifique.

Un certain nombre de facteurs de risque de progression ont été définis. Parmi eux, la détermination du statut mutationnel du gène de la partie variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV) exprimées par les lymphocytes, permet de définir deux sous-types de LLC ayant tous deux une expérience antigénique. Dans environ 50 % des cas, les cellules leucémiques présentent des mutations somatiques des IGHV et dérivent de lymphocytes B post-centre germinatif ayant rencontré l'antigène de manière T-dépendante. Dans les cas exprimant des gènes IGHV « non mutés », les cellules de LLC seraient issues de lymphocytes B pré-centre germinatif ayant rencontré des antigènes de façon T indépendante. Le statut "IGHV non muté" est généralement associé à différents facteurs de mauvais pronostic (2). Plus récemment un nombre important d'autres mutations génétiques a été décrit (3).

1. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique

La déficience des processus apoptotique

Dans cette hémopathie, les processus apoptotiques sont défectueux, contribuant au développement de la pathologie par accumulation des cellules tumorales. Les mécanismes liés à cette dérégulation ne sont que partiellement élucidés.

Plusieurs études ont décrit la dérégulation de différentes protéines impliquées dans l'apoptose, telle que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (4). Vraisemblablement par régulation épigénétique via des micro ARN : (miR) tels que les miR 15/16 (5). De la même façon, d'autres protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl2 comme Bcl-xl et Mcl-1 pourraient être impliquées (6). L'expression de cette dernière a été décrite comme étant corrélée à des marqueurs de progression ainsi qu'à un stade avancé de la pathologie (7). De plus des protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bcl-xs sont sous exprimées (8).

De ce déséquilibre résulte une survie des cellules leucémiques par défaut d'apoptose mais aussi une résistance aux traitements (9).

De plus certaines altérations chromosomiques altèrent les gènes TP53 et ATM empêchant ainsi les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN de se mettre en place. L'activation des voies NFkB ou PI3K par l'intermédiaire d'AKT et de MDM2 favorise en outre la dégradation de p53 par un processus d'ubiquitination (10).

La prolifération

L'accumulation de ces cellules B tumorales peu prolifératives a longtemps été mise principalement sur le compte d'un défaut des mécanismes d'apoptose. On sait néanmoins qu'il existe une fraction proliférative visible dans les ganglions tumoraux au niveau de nids prolifératifs enrichis en pro-lymphocytes non quiescents et en cycle cellulaire, comme l'atteste le marquage avec un anti Ki67⁺. Ce compartiment correspond à une niche où l'activité proliférative est favorisée par l'action de cytokines et de chimiokines du microenvironnement (11).

De plus, l'analyse de la longueur des télomères apporte une autre preuve de la prolifération des cellules leucémiques. Plusieurs études révèlent que les cellules leucémiques ont des télomères plus courts que les lymphocytes B normaux démontrant ainsi une augmentation de leur prolifération (12).

A côté de l'aspect cytologique des cellules tumorales circulantes et de l'histologique des ganglions ou autres tissus tumoraux, l'immunophénotype est déterminant pour le diagnostic de la maladie permettant de la distinguer des autres hémopathies lymphoïdes B constituées de petites cellules. A côté d'une expression forte de CD19 et généralement faible de CD20, le niveau d'expression de CD5, CD23, CD22, FMC7, et des immunoglobulines de surface analysés par cytométrie en flux sur les cellules circulantes, permet d'établir un score entre 0 et 5, établi par Matutes et al en 1994. Un score supérieur ou égal à 4 confirme le diagnostic de LLC et élimine les autres causes d'hyper lymphocytose. Un score inférieur à trois exclut le diagnostic de LLC et un score égal à trois correspond à une LLC atypique (13).

Le score de Matutes, a été complété en 1997 par Moreau et al, en remplaçant la caractérisation du marqueur CD22 par celle de CD79b plus pertinent au diagnostic, ces deux molécules étant directement impliquées dans la régulation du signal BCR. Le CD79b est faiblement ou pas exprimé dans les LB de LLC (Tableau 1). Depuis 1997, le score du Royal Marsden Hospital ou score Matutes est toujours d'actualité (13). (Tableau 1)

	1 point	0 point
Ig de surface	Expression faible	Expression forte
Expression du CD5	+	-
Expression du CD23	+	-
Expression du CD79b	Faible ou nulle	Forte
Expression de FMC7	-	+

Tableau 1 : Score de Matutes modifié (13)

Le marqueur CD5 est une glycoprotéine fortement exprimée par les LT et faiblement par les LB. Les LB de LLC possèdent typiquement une forte expression de CD5 à leur surface dont le rôle est directement en lien avec celui de la signalisation du BCR et aux mécanismes d'induction de l'apoptose (14). Les cellules de LLC expriment également la molécule CD23, qui est un récepteur de faible affinité pour les IgE, dont l'expression est corrélée à la progression de la pathologie. Les lymphocytes B de la LLC expriment généralement de faibles taux d'immunoglobulines de surface (fréquemment des IgM ± IgD et dans une faible proportion des cas, des IgG ou des IgA) (15). Enfin, les cellules de LLC expriment peu ou pas de FMC7.

Une classification clinique créée en 1981 par Jacques-Louis Binet, plus utilisée en France et en Europe, repose sur le nombre d'aires ganglionnaires atteintes, le plus souvent bilatérales (Figure 1), et les troubles de l'hémogramme (Table 2), permettant de classer les patients en trois groupes A, B et C (16).

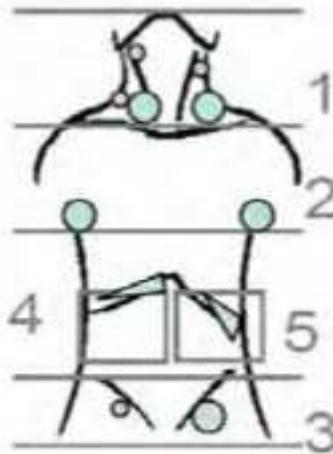


Figure 1 : Les cinq aires lymphoïdes palpables (16)

Aires lymphoïdes	Hémoglobine	Plaquettes	Stade de Binet
< 3 aires	Hb ≥ 10 g/dl	ET Plaquettes ≥ 100 G/l	Stade A
≥ 3 aires	Hb ≥ 10 g/dl	ET Plaquettes ≥ 100 G/l	Stade B
Indifférent	Hb ≤ 10 g/dl	ET/OU Plaquettes < 100 G/l	Stade C

Tableau 2 : Classification des stades de Binet (16)

La classification de Rai établie en 1975, est surtout utilisée en Amérique du Nord. Elle définit quatre stades selon l'existence d'un syndrome tumoral (adénomégalie, hépatosplénomégalie) et de cytopénies (anémie, thrombopénie) accompagnant la lymphocytose (17). (Tableau 3)

Stade	Critères de définition	Pronostic	Médiane de Survie
0	Lymphocytose > 5000 mm ³	Bon	≥ 10 ans
I	Lymphocytose + adénopathies	Intermédiaire	9 ans
II	Lymphocytose + hépato ou splénomégalie	Intermédiaire	5 - 7 ans
III	Lymphocytose + hémoglobine < 10 mg/L	Mauvais	2 - 5 ans
IV	Lymphocytose + plaquettes <100 000/μL	Mauvais	2 - 5 ans

Tableau 3 : Classification de Rai (18).

Le ganglion lymphatique est l'atteinte principale dans la forme lymphomateuse de la maladie avec un impact évolutif potentiel reconnu dans les classifications cliniques. Les mécanismes de rétention et de développement de la population tumorale dans cet organe lymphoïde ne sont que partiellement élucidés. Le microenvironnement y a un rôle probablement déterminant.

2. Les ganglions lymphatiques

Architecture du ganglion

Pour comprendre les interactions potentielles entre la population tumorale et son microenvironnement il est important de bien connaître la microanatomie d'un ganglion non tumoral et en particulier la compartimentalisation des lymphocytes B et T par rapport à la répartition des différents types cellulaires du stroma. Les ganglions lymphatiques sont des organes ovoïdes placés comme des filtres biologiques sur le trajet des vaisseaux lymphatiques drainant le réseau vasculaire (19). Ils sont formés d'un tissu conjonctif de soutien le stroma, organisé en travées qui abritent le tissu réticulaire où circulent de nombreux lymphocytes et macrophages.

Le parenchyme ganglionnaire s'organise en trois zones de la périphérie vers l'intérieur : cortex, paracortex et la zone médullaire (**Figure 2**).

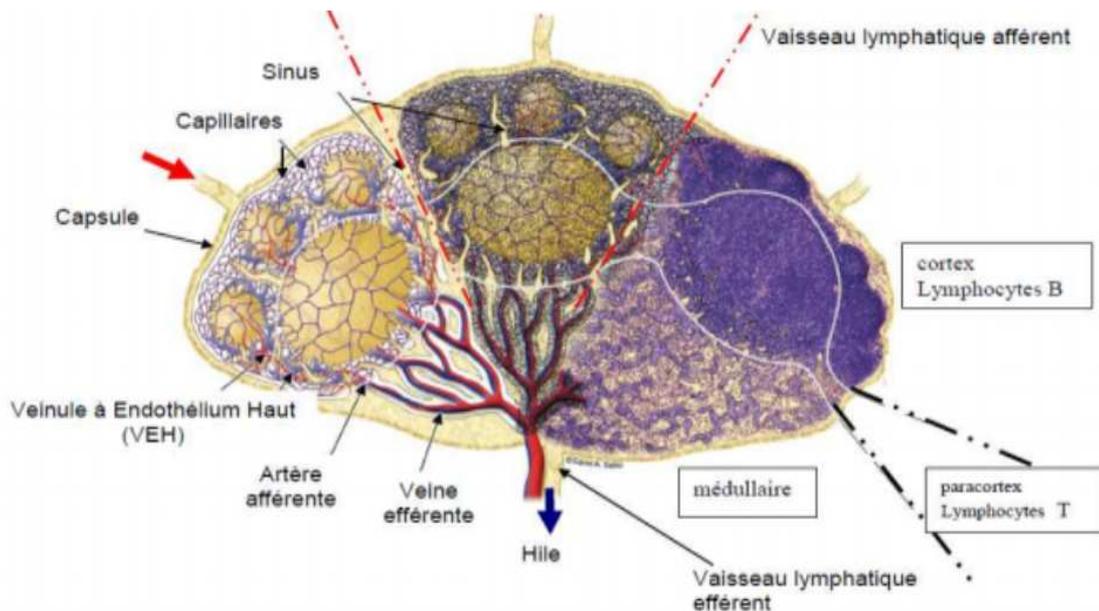


Figure 2 : Structure d'un ganglion lymphatique (19).

Le cortex (zone B) est principalement représenté par des follicules, lieux de maturation et prolifération des lymphocytes B, au centre de ces follicules se regroupent des cellules dendritiques folliculaires (FDC) formant un réseau dense au sein duquel les cellules B s'activent suite à la rencontre avec l'antigène et se différencient.

Les FDC expriment des récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines (CD16, CD23 et CD32) et les récepteurs du complément (CD21 et CD35) (**Table 4**). Les FDC expriment également des molécules d'adhérences telles que VCAM1 et MAcAM1, ainsi que des molécules communes à toutes les sous-populations de cellules stromales dans les tissus lymphoïdes, telles que la desmine et la laminine.

Les FDC produisent enfin la chimiokine CXCL13, qui dirige les cellules B exprimant le récepteur CXCR5 dans les follicules(20).

Avant tout contact antigénique, il n'existe que des follicules primaires. Les follicules secondaires n'apparaissent qu'après stimulation antigénique et sont caractérisés par des centres germinatifs (CG).

Le centre germinatif est un compartiment anatomique transitoire qui se développe dans le ganglion suite à la rencontre entre les cellules B et l'antigène de manière T dépendante. Les CG sont divisés en deux zones : une claire (LZ) et une sombre (DZ). La zone claire est proche du sinus sous capsulaire et de la zone marginale. Au niveau de la jonction entre la zone T et la zone B, les cellules B présentent l'antigène aux cellules T auxiliaires et reçoivent des signaux de co-stimulation via notamment les interactions CD40L-CD40. Les cellules sélectionnées entrent dans la DZ du CG pour y subir le mécanisme d'hypermutation somatique des Ig et entamer un cycle actif de prolifération (centroblastes). Les cellules B vont alors migrer dans la LZ où elles sont exposées aux antigènes incorporés dans les complexes immuns et présentés par les cellules FDCs. En fonction de leur affinité pour ces antigènes les cellules B seront soit éliminées par apoptose (faible affinité) où recevront les signaux d'activation de la survie (forte affinité, centrocytes). Les cellules sélectionnées pourront alors soit retourner vers la DZ pour proliférer ou sortir du CG pour devenir des cellules mémoires ou des cellules sécrétrices d'Ig (plasmocytes) après avoir été soumises aux recombinaisons de classe (switch). Les cycles répétés entre LZ et DZ permettent la sélection des cellules B les plus affines (21).

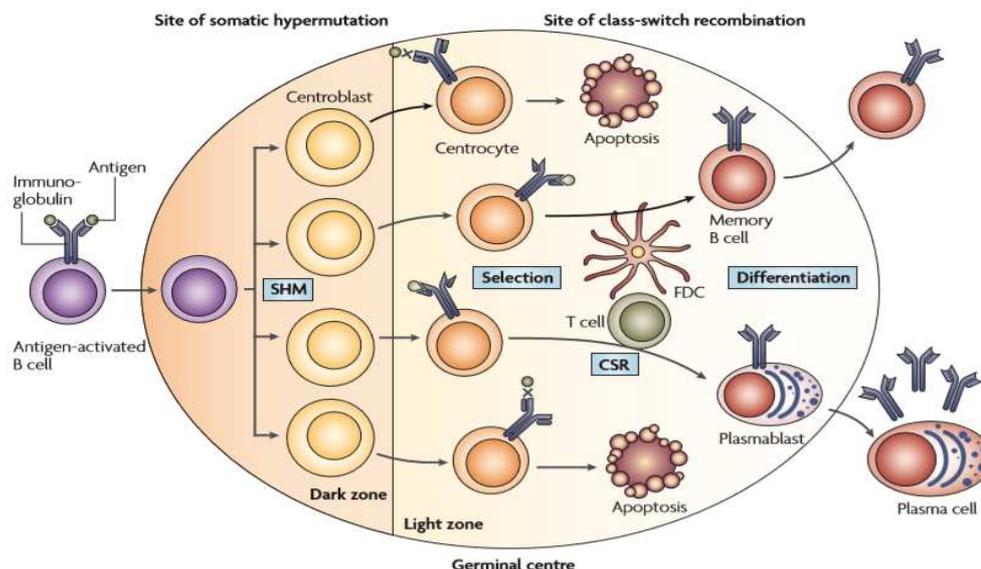


Figure 3 : Centre germinatif (22).

Le paracortex (zone T) contient une partie centrale riche en cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) entourant les venules endothéliales. Elles forment un réseau dense où sont également présents de nombreux lymphocytes T (23).

Il a été initialement supposé que le rôle des FRC dans les organes lymphoïdes était principalement structurel, contribuant ainsi à la contraction des ganglions lymphatiques pendant les réponses immunitaires et facilitant le transport de l'antigène ou des anticorps. Par la suite, d'autres études ont proposé que le transport des cytokines de la lymphe afférente aux VHE implique des conduits formés par les FRC (23), témoignant ainsi une nouvelle appréciation des fonctions du stroma lymphoïde.

Une autre étude a montré que les lymphocytes de la zone T sont constamment en mouvement et se déplacent le long des conduits de FRC qui servent de voies de guidage pour la migration cellulaire (24). Les FRC forment des conduits fermés séparés et distincts du parenchyme du tissu lymphoïde. Les petites molécules, telles que les chimiokines ou les antigènes, peuvent rentrer dans le réseau de conduits des ganglions à partir de la lymphe et sont ainsi acheminées rapidement vers les zones de lymphocytes T et les VHE (25).

Les fibres réticulaires dans les zones de cellules T sont riches en collagène et produisent la transglutaminase tissulaire et d'autres molécules impliquées dans la formation de ces fibres (**Table 4**). Les FRC expriment un antigène reconnu par l'anticorps ER-TR7 et peuvent être différenciées en cellules stromales lymphoïdes non endothéliales sur la base de l'expression de la podoplanine (gp38) (26). Les FRC sont aussi identifiables par la production de chimiokines CCL21 et CCL19 (27), qui jouent un rôle important dans l'attraction et la mobilité des lymphocytes T exprimant le récepteur CCR7 (28).

Les FRC dans les zones T chez les humains et les rongeurs expriment des composants de la matrice extracellulaire telles que la fibrilline la laminine, la fibronectine et des molécules intracellulaires présentes dans certains fibroblastes telles que la desmine et l'actine du muscle lisse (α -SMA). Celles-ci peuvent jouer un rôle fonctionnel dans la formation de réseaux FRC, les capacités contractiles et la présentation de molécules telles que les chimiokines. Les FRC expriment également des sous-unités d'intégrine, les ligands d'adhérence, la molécule d'adhésion

intercellulaire 1 (ICAM1) et la molécule d'adhésion de cellules vasculaires (VCAM1). Néanmoins, jusqu'à présent, aucun marqueur véritablement spécifique de FRC n'a été défini.

	Tissue & location	Selected markers	Functions
Fibroblastic Reticular cells (FRC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT, TLT. T cell zones.	ER-TR7, podoplanin (gp38), laminin, desmin, fibrillin, fibronectin, α -SMA, LT β R, TNFR1/2, VCAM1, ICAM1, collagen I, II, IV, integrin α 1, α 4, β 1, MHC-I, VEGF, CXCL16, CCL21, CCL19, IL-7.	Structural support; production of reticular fibers; formation of conduit network; chemokine production & expression; substrate for lymphocyte migration; APC adhesion; T cell homeostasis; antigen presentation.
Follicular Dendritic cells (FDC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT, TLT. B cell zones.	CD35, CD21, CD16, CD23, CD32, FDC-M2 (complement C4), VCAM1, ICAM1, MAdCAM1, laminin, desmin, CXCL13, CXCL12, BAFF.	Antigen capture; presentation of immune complexes; chemokine production & presentation; B cell homeostasis.
Marginal Reticular cells (MRC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT. SCS (LN) & MZ (spleen).	ER-TR7, VCAM1, ICAM1, MAdCAM1, TRANCE (RANKL), laminin, desmin, podoplanin (gp38), 1BL-11, CXCL13.	Structural support; chemokine production; conduit function.
Red-pulp fibroblasts	Spleen.	ER-TR7, desmin, laminin, integrin α 3, α 4, α 5, β 1, PDGFR α / β , ICAM1, IL-6, CXCL12.	Construct splenic cords & direct blood flow; assist in removal of dying red blood cells; control of splenic blood flow, macrophage and plasma cell attraction and retention.
LN medullary fibroblasts	Lymph node	ER-TR7, desmin, laminin, collagen III, CXCL12(?).	Macrophage and plasma cell attraction and retention?
Lymphatic endothelial cells (LEC)	Lymph nodes, spleen (?), peyer's patches, MALT, TLT.	CD31, LYVE1, VCAM1, ICAM1/2, ER-TR7, podoplanin (gp38), laminin, VE-cadherin, claudin-5, JAM-A, Prox1, Toll-like receptors, CCL21, S1P.	Transport of lymph, antigens, & cells; Facilitate entry of leukocytes into lymphatics, chemokine production & presentation.
Vascular endothelial cells (VEC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT, TLT.	PNA α (LN), CD31, CD34, VE-Cadherin, laminin, JAM-A/B/C, ZO-1/2, ESAM1, claudin-5, CCL21 (mice).	Transport of blood; entry of cells including lymphocytes from the blood into tissues.

Tableau 4 : Sous-populations stromales dans les organes lymphoïdes secondaires (29).

La zone médullaire : est un lieu d'entrée et de sortie des lymphocytes dans le ganglion, elle contient de gros vaisseaux sanguins, des sinus et des cordons médullaires contenant des plasmocytes sécrétant des anticorps. Cette zone est riche en fibroblastes médullaires, qui constituent un réseau dense de fibroblastes et de fibres réticulaires. Elle apporte un cadre aux cordons médullaires des ganglions lymphatiques, ainsi qu'un réseau lâche dans les sinus médullaires (30). On trouve de nombreux macrophages et cellules plasmiques, mais aussi des lymphocytes et des

mastocytes dans la médulla des ganglions lymphatiques (19). Compte tenu de cet environnement unique, il est probable que les cellules réticulaires médullaires jouent un rôle dans l'immunité et dans le trafic ganglionnaire. De fait, l'expression de CXCL12 est largement limitée à la zone médullaire des ganglions lymphatiques (31).

3. Trafic ganglionnaire

Les veinules HEV (High Endothelial Venules) sont les principales voies d'entrée des lymphocytes B et T du sang vers le ganglion. Cette migration se déroule en plusieurs étapes: le roulement (rolling), l'activation, l'adhérence et l'extravasation (transmigration) (Figure 3). Ces étapes permettent aux cellules de migrer en adhérant, puis de traverser les HEVs.

Le roulement des lymphocytes est dirigé par l'interaction de faible intensité entre les sélectines, principalement la L-sélectine (CD62L), exprimées par les lymphocytes B, et leurs ligands (glycoprotéines sulfatées) exprimés par les cellules endothéliales. L'étape d'adhérence et d'arrêt des lymphocytes dépend de l'action des intégrines (VLA-4 et LFA-1) exprimées par le lymphocyte et leurs ligands respectifs (VCAM et ICAM) exprimés par les cellules endothéliales.

La traversée de l'endothélium (transmigration), est régulée par les interactions entre les récepteurs de chimiokines exprimés à la surface des lymphocytes et leurs chimiokines respectives : CCR7 avec CCL21 et CXCR4 avec CXCL12. Ces chimiokines sont produites par les HEV et par les cellules stromales ganglionnaires selon un gradient de concentration attirant les lymphocytes. Enfin, la transmigration des lymphocytes met en jeu un mécanisme de diapédèse à travers les jonctions inter-endothéliales (32).

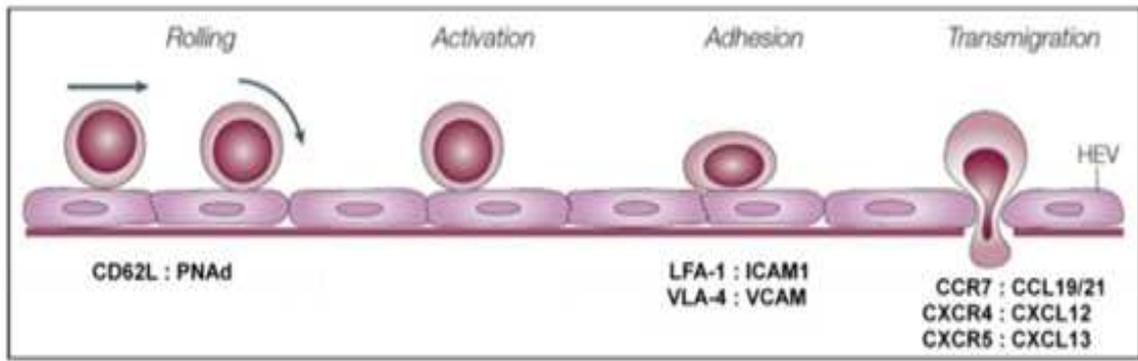


Figure 4 : Etapes d'entrée des lymphocytes dans le ganglion (33).

Suite à leur entrée dans le ganglion, les lymphocytes suivent un gradient de chimiokines secrétées par les FRC ou les FDC leur permettant de se diriger vers le paracortex ou les follicules (Figure 4).

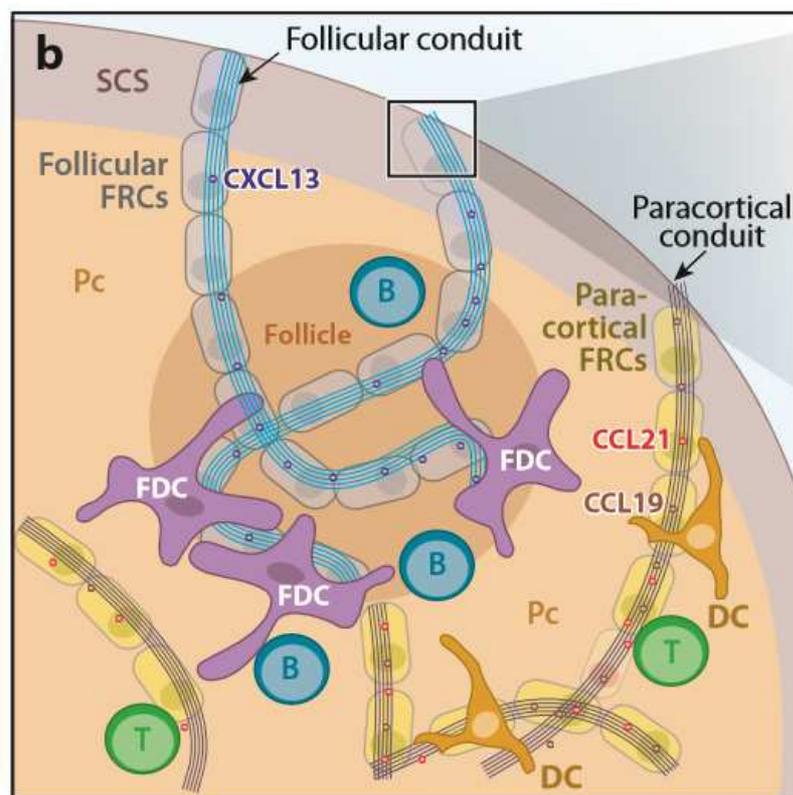


Figure 5 : Trafic cortical des lymphocytes B et T. Après leur entrée dans le ganglion, les lymphocytes se dirigent vers le sinus sous capsulaire (SSC) puis migrent au long des conduits folliculaires jusqu'aux follicules riches en CXCL13 exprimé par les FDC (34).

Les cellules B, exprimant le CXCR5, migrent vers les follicules en réponse au CXCL13 produit par les FDC (34), alors que les lymphocytes T se dirigent vers la zone paracorticale (zone T) en réponse aux CCL19 et CCL21 qui sont secrétés par les FRC. **(Figure 6)**. Les FRC dans la zone paracorticale produisent des quantités importantes de CCL21 et, dans une moindre mesure, de CCL19. La CCL21 se lie au récepteur CCR7 et fournit des indices directionnels aux cellules T, car l'absence d'expression de CCL21 chez les souris *plt /plt* empêche la localisation des cellules T dans la pulpe blanche de la rate (équivalente au paracortex ganglionnaire) (35). Les FRC et la CCL21 régulent donc l'accès des cellules T naïves au paracortex et permettent également de diriger les mouvements des cellules T dans ce domaine paracortical (24). Ceci est probablement dû à l'absence d'expression de CCL21 dans les follicules de cellules B riches en CXCL13 et à l'absence de récepteur pour CXCL13, CXCR5, sur les lymphocytes T naïfs.

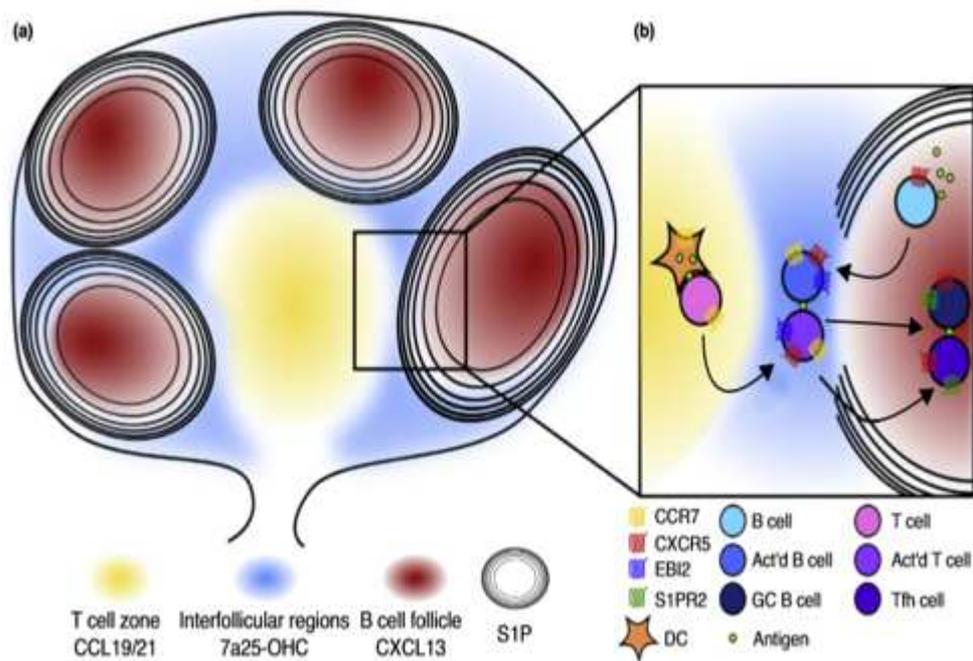


Figure 6 : Gradient des chimiokines créé par les cellules stromales responsables de la migration ganglionnaire : (a) les différentes régions du ganglion présentent des gradients différents des chimiokines : CCL19 et CCL21 produites par les FRC sont fortement exprimées dans la zone T. CXCL13 produite par les FDC est fortement exprimée dans les follicules dans la zone B. S1P est fortement exprimé dans le sang et faiblement dans le ganglion. (b) les cellules dendritiques et les lymphocytes T exprimant le CCR7 sont attirés vers la zone T riche en CCL19 et CCL21, ce qui permet l'activation des cellules T par les

cellules dendritiques porteuses de l'antigène. Les lymphocytes B exprimant le CXCR5 se dirigent vers les follicules où elles rencontrent l'antigène et deviennent actives. Les cellules T activées expriment le CXCR5 et EB12 alors que B activées expriment le CCR7 et EB12, ce qui permet leur interaction. La diminution de l'expression de CCR7 et l'augmentation de l'expression du S1PR2 à la membrane des lymphocytes B favorisent leur migration vers le follicule pour former le centre germinatif (36).

Le devenir des lymphocytes B dans le ganglion est fonction de leur rencontre avec l'antigène.

Les cellules qui ont rencontré leur antigène spécifique prolifèrent et forment des CG après interaction avec les cellules T spécifiques. Seuls les clones avec l'affinité la plus élevée sont sélectionnés pour survivre dans les CG (22). Ces lymphocytes pourront subir une commutation de classe pour donner les plasmocytes sécrétant les Igs de différent isotope soit devenir des cellules B mémoires.

En l'absence de liaison avec l'antigène, les cellules B passent dans les sinus corticaux, rejoignent le sinus médullaire et sortent du ganglion par le vaisseau lymphatique efférent. Le gradient de Sphingosine-1-Phosphate (S1P) est responsable du passage des lymphocytes du cortex au réseau de sinus lymphatiques. En effet, le sang et la lymphe sont concentrés en S1P alors que sa concentration ganglionnaire est faible. De plus, les lymphocytes régulent l'expression membranaire de S1PR1 (récepteur de la S1P) soit négativement au cours de leur entrée, soit positivement pour la sortie vers le sinus lymphatique(32), (34).

4. Altérations du microenvironnement de la LLC

Alors que dans un ganglion non tumoral, la structure est bien organisée, dans un ganglion de patient atteint de LLC l'invasion des tissus lymphoïdes primaires et secondaires par les cellules tumorales s'accompagne d'une perturbation de l'architecture et de la physiologie des tissus. Notamment un processus de rétention des cellules B de LLC est observé dans ces organes.

Les cellules de LLC conservent la capacité de répondre aux signaux du microenvironnement tissulaire qui entraînent des modifications de leur expression

génique, de leur activation, de leur prolifération et de leur seuil de réponse apoptotique (37). En particulier, une étude génomique des cellules de LLC purifiées du sang périphérique, de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques a montré que l'activation de voies de signalisation spécifiques conduit à des profils d'expression génique caractéristiques par rapport à d'autres lymphomes (38).

En particulier, dans des cellules LLC isolées de ganglion lymphatique une expression de plus de 100 gènes impliqués dans l'activation du BCR, dans la signalisation NF- κ B et dans la prolifération a été caractérisée. Plusieurs études ont décrit des niveaux différents d'expression des marqueurs d'activation et des taux de prolifération dans les cellules LLC issues des différents sites anatomiques.

La survie des lymphocytes B

Le microenvironnement joue un rôle critique dans la survie des lymphocytes B. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) exercent notamment ce rôle via l'interaction de VCAM avec VLA-4 exprimé par les cellules B, par la sécrétion de facteurs solubles tels que la chimiokine CXCL12 (39), par des cytokines ou encore des facteurs pro-angiogéniques tel le VEGF. Ces facteurs induisent l'activation des voies NF- κ B et AKT qui entraînent l'augmentation des protéines de la famille Bcl2, notamment Mcl-1 responsable de l'inhibition de l'apoptose (40) (**Figure 7**).

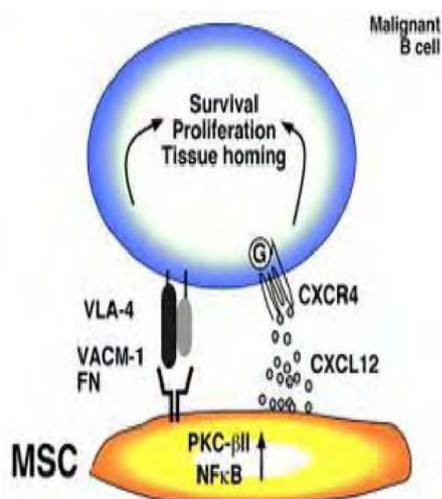


Figure 7: Dialogue entre la cellule leucémique et la MSC (41).

D'autre part, au sein des centres prolifératifs, dans les ganglions lymphatiques, une proportion significative de lymphocytes T CD4⁺ est activée et exprime le CD40L

qui en se liant aux cellules leucémiques exprimant CD40, favorise la survie et la prolifération de ces dernières (**Figure 8**).

Cette interaction induit aussi la production de CCL3 et de CCL4 par les lymphocytes B, ce qui permet le recrutement de monocytes précurseurs des macrophages.

Les lymphocytes T peuvent aussi avoir des effets pro-tumoraux, et stimuler la croissance des cellules leucémiques en produisant du TNF- α (42).

Par ailleurs, les cellules leucémiques présentent une expression réduite des récepteurs de mort et un défaut d'apoptose intrinsèque, qui les rend moins sensibles aux effets cytotoxiques des lymphocytes T (43). De plus, ces lymphocytes cytotoxiques sont moins efficaces dans leur activité de reconnaissance des cellules tumorales.

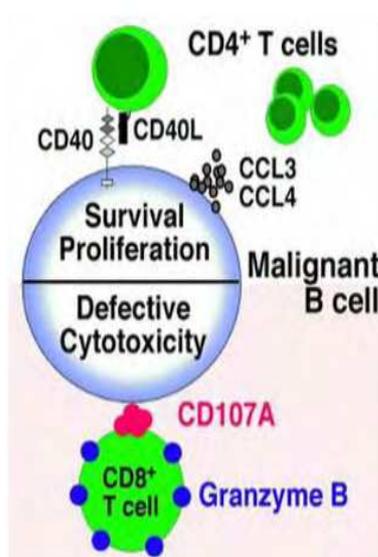


Figure 8 : Dialogue entre cellules B de LLC et cellules T (41).

De manière générale de nombreuses cellules impliquées dans la réponse anti tumorale (LT, cellules NK, CD8+ cytotoxiques) présentent des défauts fonctionnels empêchant l'activation des processus anti-tumoraux ce qui contribue à l'échappement à la surveillance immunitaire des cellules de LLC.

En parallèle, des cellules d'origine monocyttaire favorisant la survie des cellules tumorales, sont présentes de façon significative dans le microenvironnement.

Ainsi, le microenvironnement contribue au développement de la pathologie et facilite également l'apparition de résistances aux différents traitements. La mort rapide des LB de LLC *in vitro* est d'ailleurs le reflet de la perte de ces signaux de

survie et de l'importance du microenvironnement tumoral dans le maintien de la pathologie (44).

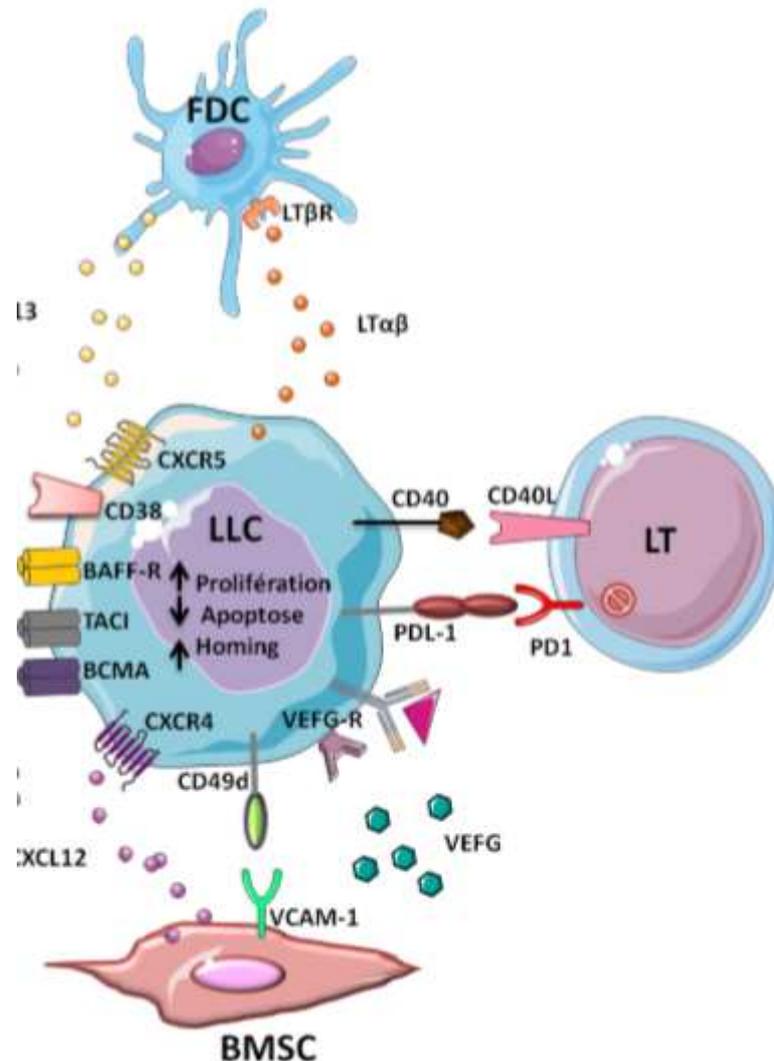


Figure 9. Le microenvironnement tumoral de la LLC. Le microenvironnement de la LLC favorise la survie et la rétention des LB de LLC par l'intermédiaire de contacts cellulaires ainsi que par différents facteurs solubles (cytokines et chimiokines). Illustration réalisée d'après (45). BMSC= cellules stromales (Bone marrow stromal cell), BAFF= B cells activating factor, BAFF-R= B cells activating factor receptor, APRIL= A proliferation-inducing ligand, TACI= Transmembrane activator and CAML interactor, BCMA= B cells maturation antigen.

5. Altération du trafic dans les tissus lymphoïdes des cellules de LLC

Le trafic des cellules de LLC est assuré par deux sous-groupes principaux de chimiokines. Les chimiokines homéostatiques, produites et sécrétées de façon

constitutive au sein du microenvironnement tissulaire, maintiennent le trafic physiologique. Les chimiokines inflammatoires, principalement induites dans les tissus inflammés, permettent de recruter des cellules effectrices (46).

Les taux sériques de certaines chimiokines et l'expression de leurs récepteurs spécifiques sont très élevés dans la LLC. Par conséquent une réponse chimiotactique plus efficace est une caractéristique des sous-types les plus agressifs des cellules de la LLC. La réactivité à la stimulation par les chimiokines des cellules de LLC circulantes pourrait faciliter leur trafic, leur migration et l'envahissement des cellules du microenvironnement tissulaire leucémique.

Parmi ces chimiokines CXCL12, une chimiokine homéostatique qui joue un rôle essentiel dans le trafic normal, est un exemple de chimiokine qui régule de manière critique la migration des cellules de LLC. CXCL12 est sécrétée de manière constitutive à des niveaux élevés par les cellules stromales et son récepteur CXCR4 (CD184) est fortement exprimé à la surface des cellules de LLC circulantes (ref), qui migrent plus efficacement vers CXCL12 que les lymphocytes B normaux (47). En particulier, les cellules de LLC exprimant CD38 et /ou ZAP70 présentent une signalisation intracellulaire plus importante et un meilleur chimiotactisme en réponse au CXCL12 que les cellules n'exprimant pas le CD38 ou ZAP70 (47).

CXCL13 est une autre chimiokine homéostatique qui, avec son récepteur spécifique, CXCR5, joue un rôle central dans le recrutement des cellules B dans la zone folliculaire des organes lymphoïdes secondaires (20). CXCL13 est sécrétée de manière constitutive par les cellules stromales dans les zones de cellules B des tissus lymphoïdes secondaires (48). Les taux sériques de CXCL13 sont plus élevés chez les patients atteints de LLC que chez les individus sains, et CXCR5 est également fortement exprimé à la surface des cellules B de LLC (48). CCL19 et CCL21 sont des chimiokines connues dans la régulation du recrutement des lymphocytes dans les zones T des tissus lymphoïdes secondaires en se liant à leur récepteur spécifique CCR7 (49). CCL19 et CCL21 sont également présentes dans le stroma et dans les veinules endothéliales des ganglions lymphatiques de LLC, et ces dernières constituent une voie importante d'entrée des lymphocytes dans le tissu lymphoïde secondaire (50). De manière intéressante les cellules B circulantes en

particulier les cellules de LLC ZAP-70⁺ ou provenant des patients montrant une adénopathie importante, expriment des taux élevés de CCR7 (50), ce qui favorise une migration importante vers CCL21 et CCL19 (47).

Les cellules de LLC ne sont pas seulement capables de répondre aux signaux du microenvironnement tissulaire, mais elles recrutent également des cellules d'interaction via la sécrétion de chimiokines telles que CCL17, CCL22, CCL3 et CCL4. CCL22 et CCL17 sont des chimiokines sécrétées par les cellules de LLC activées par CD40 dans les ganglions lymphatiques, attirant ainsi les cellules T. Ainsi, les cellules de LLC peuvent attirer les cellules T CD4⁺ vers la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, ce qui augmente la prolifération et la survie des cellules tumorales et induit une libération supplémentaire de CCL22, créant ainsi une boucle de rétroaction positive favorisant le processus malin (51). CCL3 et CCL4 sont des chimiokines pro-inflammatoires cruciales pour la réponse à l'infection, la médiation de l'inflammation et le recrutement de monocytes ou des cellules T du sang qui expriment les récepteurs spécifiques CCR1 et CCR5 dans les compartiments tissulaires (51).

6. Modèles du microenvironnement de la LLC

L'étude des modifications du microenvironnement ganglionnaire dans la LLC est très importante pour la compréhension de la maladie. En revanche l'accès aux cellules résidentes des tissus lymphoïdes est très difficile, donc la modélisation des interactions tumeur-hôte est un domaine d'investigation intense.

Actuellement, le modèle *in vivo* le plus largement utilisé pour la LLC est la souris transgénique TCL1, dans laquelle le gène humain TCL1 est exprimé sous le contrôle du promoteur et de l'amplificateur de la région variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (52). TCL1 est un oncogène généralement activé dans les lymphomes T, il est impliqué dans la signalisation passant par la kinase AKT. Les cellules tumorales des souris transgéniques TCL1 sont des cellules lymphoïdes relativement grandes, exprimant les gènes non mutés de l'IGHV. Ces cellules présentent une activation de la voie du BCR et une dérégulation du compartiment T, similaire à celles décrites dans la LLC chez l'homme (53).

Contrairement au modèle transgénique, les souris New Zealand Black (NZB) développent spontanément une auto-immunité et une hyperactivité des lymphocytes

B, tandis qu'une maladie similaire à la LLC se manifeste plus tardivement (54). Les souris NZB présentent une mutation ponctuelle dans la séquence 3 du pré-miR-16-1, qui entraînerait une diminution des niveaux de miR-16 dans les tissus (55). Cette mutation est similaire à la mutation chromosomique la plus courante dans la LLC chez l'homme, la délétion de la région chromosomique 13q14 contenant les gènes mir-15a / 16-1 et DLEU2 (56).

Récemment, une étude a montré que la suppression de la région minimale délétée (MDR) 13q14, hébergeant le groupe DLEU2 / miR-15a / 16-1 chez des souris entraînait le développement d'une maladie ressemblant à la LLC chez l'homme (57). Les cellules leucémiques de ces souris expriment des gènes IGHV non mutés (57). D'autres modèles de souris transgéniques de la LLC comprennent des souris F1 (NZB × NZW) programmées pour exprimer l'IL5 (58), des souris surexprimant à la fois BCL2 et un facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (59) et des souris transgéniques myc/Baff (60).

D'autres approches complémentaires sont utilisées, comme des xénogreffes de la lignée cellulaire Mec-1 (61) ou des cellules primaires de LLC (62).

Malgré le développement des différents modèles murins, aujourd'hui il n'existe pas un modèle du microenvironnement tumoral de la leucémie lymphoïde chronique pour étudier *in vivo* ses interactions et son dialogue avec les cellules leucémiques.

II. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Parmi les cellules du microenvironnement, les macrophages semblent jouer un rôle primordial dans la survie, la prolifération et la rétention des cellules de LLC.

1. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules myéloïdes, retrouvées dans les tissus et qui proviennent de la différenciation des monocytes circulants après leur extravasation (63). Ils s'accumulent au niveau du site infectieux et ainsi permettent l'élimination des corps étrangers en captant des particules opsonisées, qu'ils intègrent par endocytose puis dégradent. Ils sont capables de présenter les antigènes aux effecteurs de l'immunité adaptative (63). Ils contrôlent ainsi l'homéostasie des tissus et l'amplitude de la réponse inflammatoire en produisant des cytokines, facteurs de croissance, protéases et autres molécules.

On retrouve principalement deux sous type de macrophages définis suivant leurs effets pro ou anti inflammatoires selon leurs différenciations. Les macrophages décrits comme immunostimulant et induisant une réponse pro-inflammatoire ont été appelés M1 et induisent la résistance contre les pathogènes et les tumeurs. Les macrophages décrits comme immunorégulateurs et dénommés M2, initient des résistances contre les parasites, et sont impliqués dans l'immunorégulation, la réparation et le remodelage des tissus (Figure 10).

Cette polarisation n'est pas définitive : un M1 peut se différencier en M2 et inversement suivant les stimuli qu'il reçoit (64).

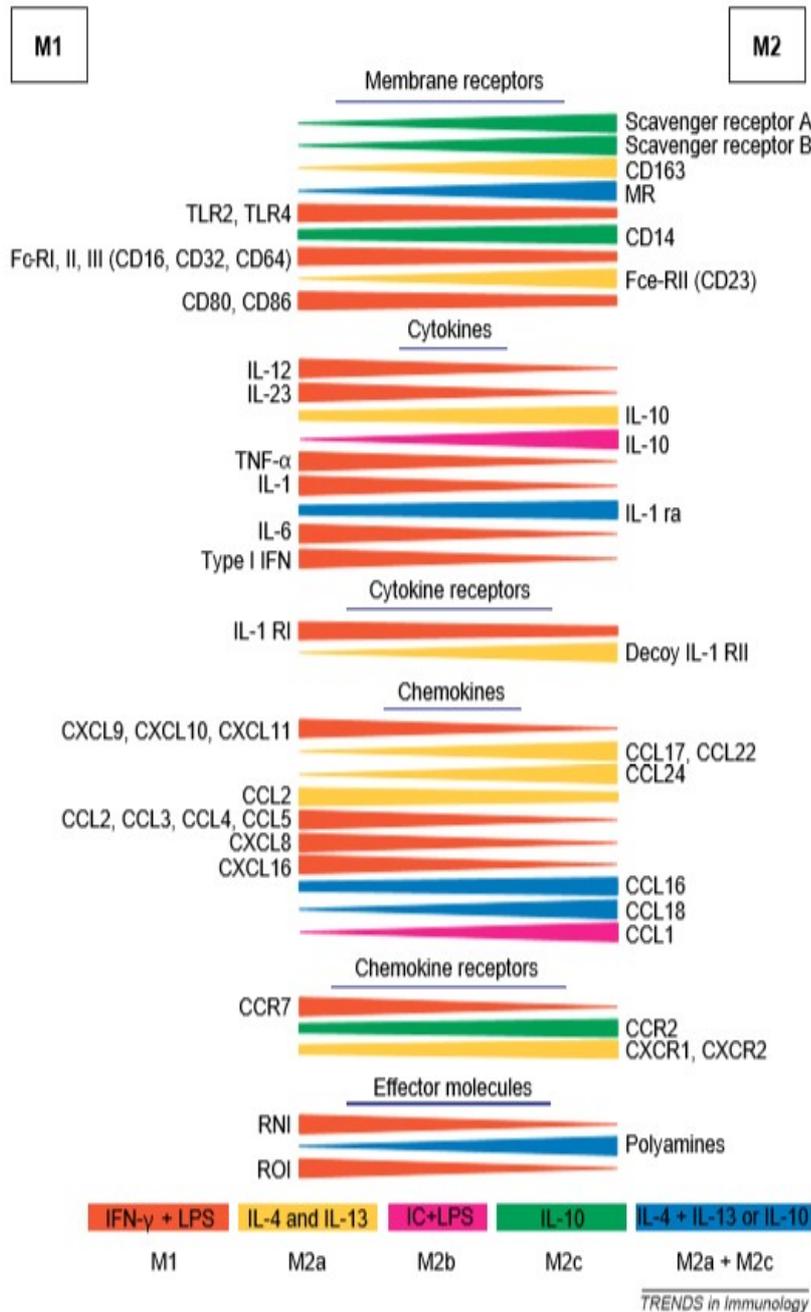


Figure 10 : Phénotype des Macrophages selon leur polarisation : L'exposition à différents stimuli dérivés des tissus induit des profils de polarisation distincts. L'activation des macrophages M1 est induite par l'exposition à l'IFN-γ et au LPS, et elle induit un ensemble distinct de molécules (indiquées en rouge). Différentes formes d'activation des M2 peuvent être dues à divers stimuli, avec des profils moléculaires distincts. IL-4 et IL-13 induisent M2a (jaune), les complexes immuns LPS induisent M2b (magenta) et IL-10 induit M2c (vert). Les molécules communes pour M2a et M2c (induites à la fois par IL-4, IL-13 et IL-10) sont indiquées en bleu (64).

2. Les macrophages de type M1

Les macrophages de type M1 sont pro-inflammatoires et ont une très forte activité antimicrobienne et anti tumorale (65). Leur polarisation est induite par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , les LPS (lipopolysaccharides) ou les agonistes des TLR (66). Les M1 sont capables de produire le TNF- α et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23, des médiateurs impliqués dans le recrutement et la polarisation des cellules de type Th1, comme l'IL-12, permettant ainsi d'augmenter l'immunité adaptative (cellules T CD4+, cellules T CD8+). Les M1 produisent en revanche peu d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Tous ces mécanismes d'activation induisent le relargage des enzymes lysosomales, des espèces réactives de l'oxygène et de l'oxyde nitrique. Les facteurs de transcription impliqués dans la polarisation M1 sont principalement NF-kB, STAT1 et IRF5 (67). Les macrophages ont la capacité de reconnaître directement les antigènes de surface et de les présenter en grande quantité associés aux molécules du CMH de classe II (CMH-II) et à des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 (66), à l'origine de leur forte capacité de présentation antigénique (Figure 11) (68)

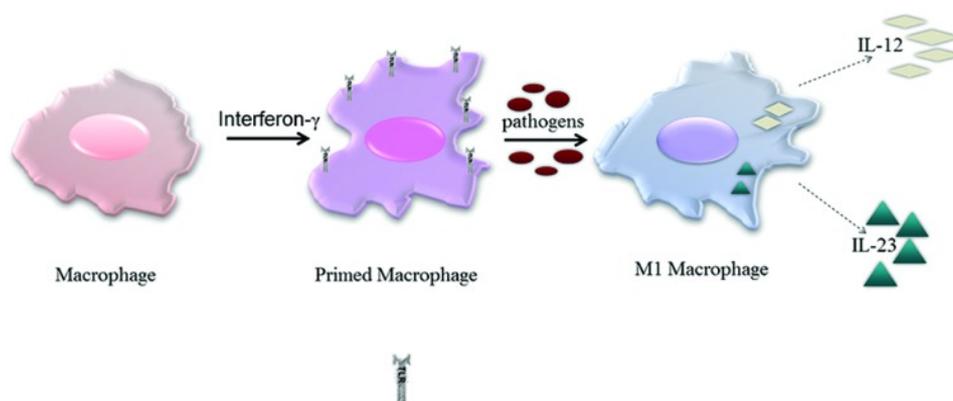


Figure 11 : Représentation schématique de la polarisation des macrophages en macrophages M1. L'INF- γ stimule les macrophages induisant une augmentation de l'expression des récepteurs de type TLR, de sorte qu'en présence d'agents pathogènes (rouges) ou de produits pathogènes (Lipopolysaccharide), ces macrophages sensibilisés acquièrent un phénotype M1 libérant des cytokines, notamment l'IL-12 et IL-23 (68).

Les macrophages de type M2

Les M2 sont caractérisés par une forte capacité phagocytaire, un important niveau d'expression de protéines « scavengers » et une production de fortes quantités de prostaglandines, de TGF- β et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (**Figure 12**) (64). Les macrophages M2 sont impliqués dans l'immunorégulation, le remodelage tissulaire, la réparation des tissus après une inflammation (69).

Il existe trois sous types de macrophages M2 définis selon les facteurs permettant leur polarisation, selon leur caractérisation phénotypique (profil d'expression de marqueurs membranaires) et leur caractérisation fonctionnelle (65).

Les macrophages M2a sont principalement impliqués dans la réponse anti parasitaire et dans le déclenchement des allergies. Les M2a produisent de grandes quantités des chimiokines CCL17 et CCL22, impliquées dans le chimiotactisme des lymphocytes polarisés Th2 et Treg (70) et CCL18 qui favorise le recrutement des lymphocytes T naïfs (71).

Ces macrophages sont impliqués dans les réactions allergiques et l'élimination des parasites car ils sécrètent aussi la CCL24, induisant le recrutement des éosinophiles. L'IL-4 et l'IL-13 induisent l'expression du récepteur au mannose (CD206) ainsi que les scavenger récepteurs A et B, tous les trois indispensables à la phagocytose des débris présents au niveau du site de l'inflammation (68).

Les macrophages M2b sont spécialisés dans la régulation des processus inflammatoires à la fois en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) mais aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α et des molécules toxiques (68).

Les macrophages M2c sont impliqués dans les phases de résolution de l'inflammation. Ils sécrètent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF β . Ils sont activés par l'IL-10 ou en réponse au TGF et aux hormones glucocorticoïdes. Leur production de TGF permet l'activation de l'angiogenèse (72). Ils participent aussi au remodelage tissulaire.

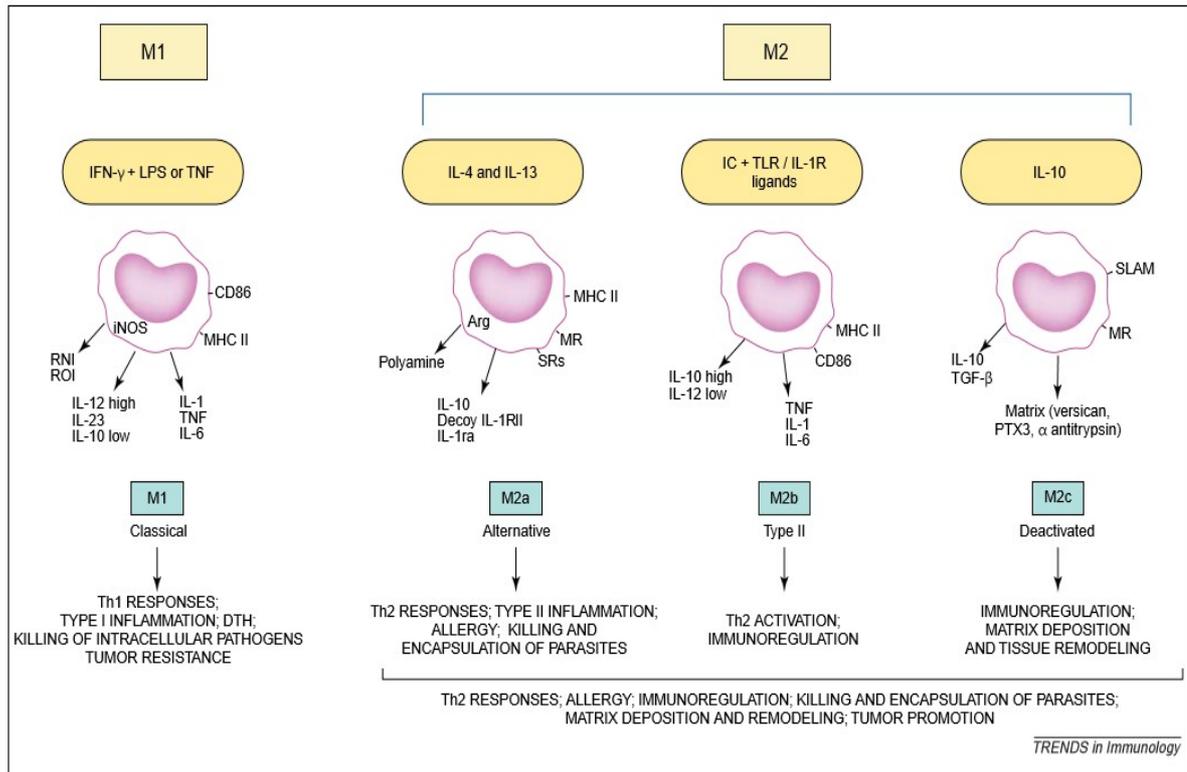


Figure 12 : Polarisation et propriétés fonctionnelles de différentes populations des macrophages. L'exposition des macrophages à l'IFN γ + lipopolysaccharide (LPS) ou le tumor necrosis factor (TNF α) entraîne la polarisation de M1 alors que les M2 sont générés en réponse à l'interleukin-4 et 13 (IL-4,IL-13) (M2a), (les M2b) sont induites par l'exposition aux complexes immuns + ligands des Toll-like receptor (TLR), alors que les M2c sont induits par l'IL-10 (68).

2. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Plusieurs études ont décrit une forte présence de macrophages dans les tumeurs solides. La balance des cytokines et d'autres signaux moléculaires détermine le rôle anti- ou pro-tumoral de ces macrophages qui ont été ainsi nommés TAM (65). Actuellement, des études montrent que environ 80 % des TAM ont un effet pro-tumoral et seulement 10 % démontrent un effet anti-tumoral (73). Dans la majorité des cas, les macrophages favorisent l'initiation, la progression et la formation de métastases (74). Sous l'effet des signaux du microenvironnement tumoral les macrophages recrutés au niveau de la tumeur se polarisent vers un phénotype immunosuppressif.

Différenciation

Les TAM sont d'origine monocyttaire de la phase circulante (75). Leur polarisation est régulée à la fois par l'ensemble des facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral et par les composants de la matrice extracellulaire. Par ailleurs plusieurs facteurs responsables du recrutement de monocytes montrent une expression augmentée dans différentes tumeurs.

Le recrutement

Les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement secrètent de nombreux facteurs solubles notamment des cytokines et chimiokines inflammatoires et des facteurs de croissances (Figure 11) impliqués dans le recrutement des monocytes. L'interaction des chimiokines avec leur récepteur à la surface des monocytes induit un changement de conformation des intégrines présentes à leur surface. On parle d'activation des intégrines. Les intégrines activées permettent la fixation des monocytes sur les cellules endothéliales et leur migration transendothéliale. De plus, l'activation des intégrines provoque une redistribution des filaments d'actine. Ces filaments passent d'une distribution symétrique autour de la cellule à une localisation polaire. Les monocytes vont ainsi acquérir une morphologie dite polarisée qui permet la migration à travers les tissus (76). Les monocytes et les macrophages migrent dans les tissus sous l'influence du CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1 ; MCP-1), fortement sécrétée dans plusieurs tumeurs. Des études ont montré une corrélation entre un niveau augmenté de CCL2 et une accumulation des macrophages dans différents cancers : des cancers pulmonaires (77), du sein (78) de l'ovaire (79) et de la prostate (80).

Le CCL2 est responsable non seulement du recrutement des monocytes, mais aussi de leur différenciation. L'inhibition de la signalisation CCL2-CCR2 bloque le recrutement de monocytes inflammatoires, inhibe les métastases *in vivo* et prolonge la survie des souris porteuses de tumeur(80). De nombreuses autres chimiokines pourraient aussi être impliquées dans le recrutement des TAM, comme CCL5, CCL3 et CXCL8 (IL8) qui sont surexprimées dans différentes tumeurs chez l'homme (81).

D'autres chimiokines, cytokines et facteurs de croissance participent aussi au recrutement des monocytes tels que le TGF- β ou le VEGF, (Vascular Endothelial Growth Factor A) produits lors de situations hypoxiques au sein de la tumeur (82). L'endothelin-2 ou le M-CSF (monocyte colony stimulating factor) (82) qui sont fortement exprimés dans le sérum des personnes atteintes de cancer du sein ou de l'ovaire (83), participent également à ce recrutement (**Figure 11**). Certaines molécules de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que leurs fragments protéolytiques permettent aussi le recrutement des monocytes (66).

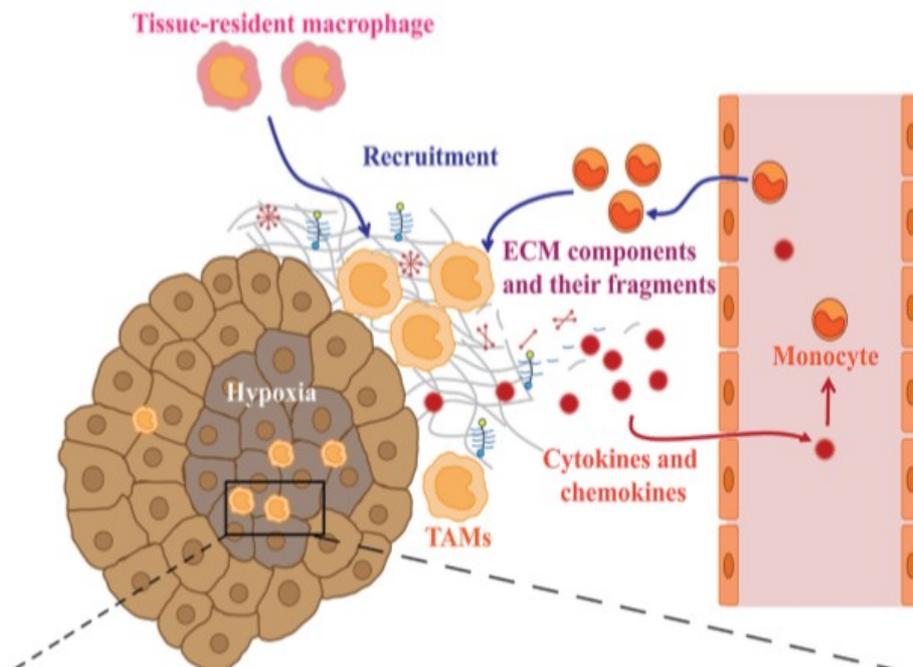


Figure 13 : Mécanisme de recrutement des monocytes au sein des tumeurs. Les monocytes circulants et les macrophages résidant dans les tissus sont mobilisés dans la tumeur en réponse à de multiples signaux microenvironnementaux tels que les cytokines, les chimiokines, les composants de la matrice extra cellulaire et l'hypoxie (66).

Les TAM expriment le marqueur des macrophages tissulaires CD68 (84), et des marqueurs de macrophage type M2 : CD163 et le CD204, deux récepteurs scavengers, ainsi que le CD206 un récepteur au mannose (85). En plus des marqueurs des macrophages les TAM expriment des marqueurs des cellules tels que le CD14 et le CD11b (86). Une étude du profil transcriptomique à haute résolution a été utilisée pour identifier et confirmer de nouveaux marqueurs membranaires sélectifs pour les

macrophages M1 dont CD120b, TLR2, SLAMF7 et pour les M2 dont CD1a, CD1b, CD93, CD226. Les résultats ont montré une corrélation phénotypique plus forte que les marqueurs des TAM précédemment identifiés.

En général, les TAM ressemblent aux macrophages M2 et peuvent également être caractérisés par la production de cytokines telles que le TGF- β , le VEGF ou l'IL-10 (87).

Les TAM ont été impliqués dans de nombreuses étapes de la progression tumorale, la formation des métastases, l'angiogénèse, la suppression de la surveillance immunitaire et la résistance au traitement (**Figure 14**).

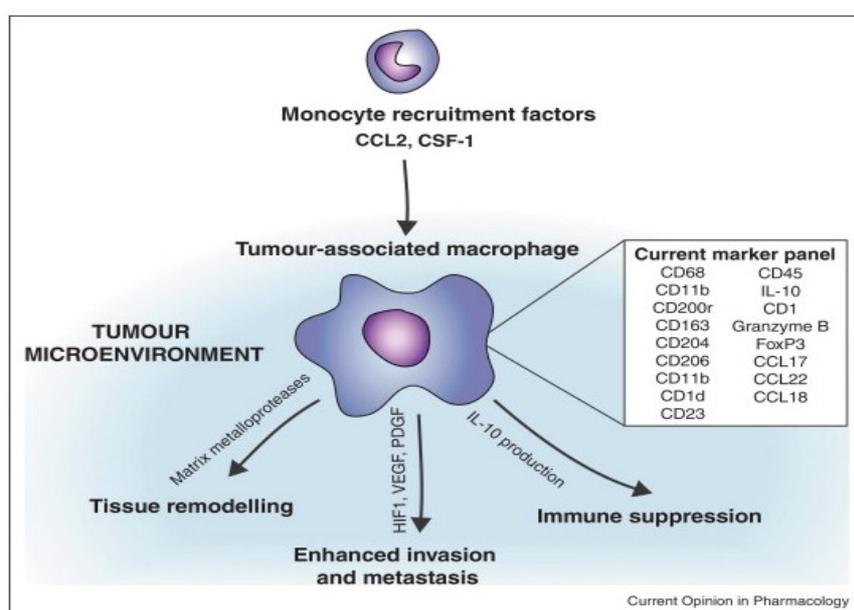


Figure 14 : Fonctions des TAM : rôles pro tumoraux (87).

Les TAM sont présents dans les zones hypoxiques de la tumeur et ils jouent un rôle important dans la néoangiogénèse dans les tumeurs primitives, via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF (88). La présence des macrophages sécréteurs de VEGF-A augmente ainsi la malignité des tumeurs au sein des zones hypoxiques (89). Les macrophages favorisent de la même manière la néo angiogénèse dans les modèles de glioblastome (90).

La caractérisation des TAM angiogéniques montre qu'ils expriment TIE2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains). La déplétion de cette population inhibe l'angiogénèse dans divers modèles, notamment le glioblastome

(91). Ces macrophages Tie2⁺ sont souvent alignés le long de la surface abluminale des vaisseaux sanguins et interagissant avec le ligand ANG2 présent à la membrane des cellules endothéliales. Le ciblage de ANG2 ou de Tie2 libère cette association entre les macrophages et les vaisseaux et inhibe l'angiogenèse dans des modèles de cancer du sein et du pancréas (92).

Les monocytes et les macrophages sont considérés comme des promoteurs de métastases car ils favorisent l'extravasation, la survie et la croissance persistante des cellules métastatiques (93).

Les tumeurs primaires impactent la fréquence et la spécificité des sites de croissance métastatique en établissant des niches pré-métastatiques assurant aux cellules un site protecteur de croissance (94). Les cellules myéloïdes CD11b⁺ VEGFR1⁺ sont fortement présentes dans ces niches et leur ablation inhibe la formation de ces sites (94). D'autres facteurs sont également importants pour la formation de ces niches pré-métastatiques. Parmi eux les exosomes dérivés de tumeurs qui éduquent les cellules myéloïdes pro-angiogéniques au travers de l'activation du récepteur tyrosine kinase MET (95).

De même, les plaquettes jouent un rôle important dans la formation des niches *via* les dépôts de la fibrine qui a un rôle dans la coagulation. Elle attire les cellules myéloïdes dans les tissus cibles, par ailleurs les anticoagulants bloquent la formation des niches pré-métastatiques (96). Des études sur des métastases pulmonaires montrent que, dès leur arrivée sur le site cible, les cellules tumorales et les plaquettes associées forment des microclots et s'arrêtent dans les vaisseaux tissulaires cibles (96). Cet arrêt permet au CCL2 synthétisé par les cellules tumorales de générer un gradient chimioattractif qui recrute les monocytes Ly6C *via* l'expression du récepteur au CCL2, le CCR2 (78). Ces monocytes recrutés améliorent l'extravasation des cellules tumorales en partie grâce à l'expression du VEGF, responsable de la perméabilité vasculaire (Figure 15).

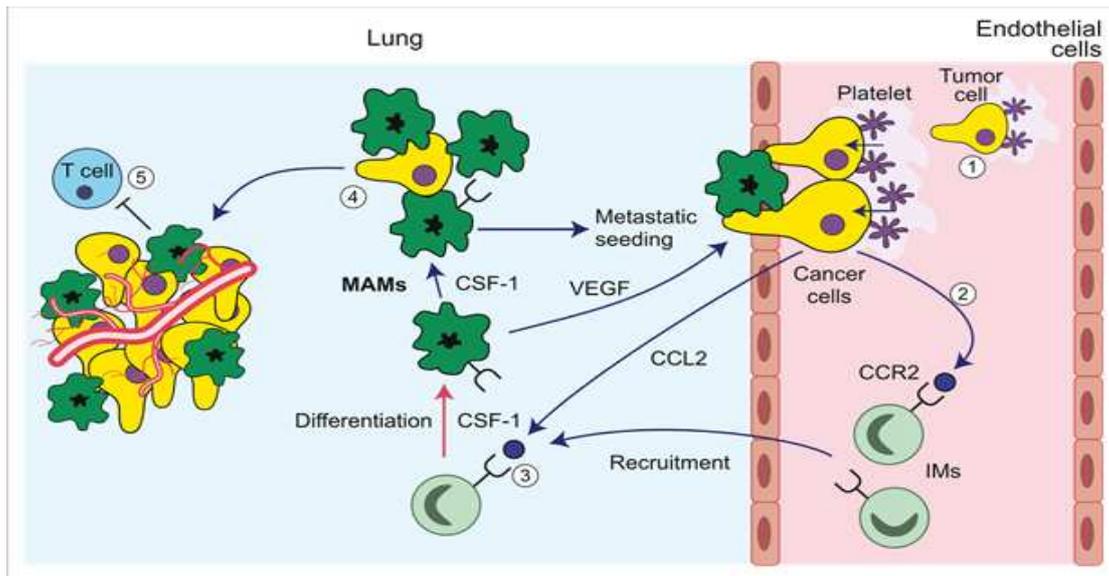


Figure 15 : Les macrophages favorisent les métastases. L'arrêt de cellules tumorales dans le système vasculaire des organes cibles 1 se traduit par un recrutement induit par le CCL2 de monocytes inflammatoires circulants exprimant le CCR2 2. Ces monocytes se différencient en macrophages associés à des métastases (MAM) qui médient une extravasation de cellules tumorales via le VEGF, ce qui augmente la perméabilité vasculaire 3. Les MAMS, sous influence de CSF-1 favorisent également la survie des cellules tumorales 4 et une croissance persistante associée à l'angiogénèse. 5 Ils pourraient également inhiber les cellules T cytotoxiques (78).

Rôle dans l'immunosuppression : une fonction essentielle des TAM est la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale via l'inhibition des lymphocytes T. L'analyse de l'expression génique dans des modèles murins de cancer du sein et de fibrosarcome montre des profils de transcription immunosuppresseurs en exprimant notamment des facteurs tels l'IL-10 et le TGF β (97), (98).

La production de l'IL-10 et du TGF- β induit la différenciation des cellules T en T régulateurs et leur recrutement au site tumoral (99)

Il a été montré que les TAM expriment les ligands des récepteurs PD-1 et CTLA-4 présents sur les lymphocytes B et T. L'expression de PD-L1 (programm cell death ligand 1) est induite à la surface des TAM, par CSF-1, l'IL-4, l'INF- γ ou encore l'hypoxie. La fixation de ces ligands sur leurs récepteurs respectifs induit une inhibition directe de la signalisation liée à l'activation du TCR et du BCR et donc une altère la réponse anti-tumorale B et T (100),(101).

3. Les Nurse Like Cells (NLC, cellules chaperonnes)

Les NLC ont été décrites comme des cellules adhérentes, allongées ressemblant à des fibroblastes de grande taille, issues de la différenciation *in vitro* des PBMCs isolés de patients atteints de LLC.

Le nom de « nurselike » provient de la similarité de ces cellules avec les « nurses cells » présentes dans le thymus qui délivrent des signaux pro-survie aux précurseurs des lymphocytes T lors de leur différenciation (12).

De même les NLC délivrent des signaux de survie aux cellules leucémiques qui notamment sont résistantes à l'apoptose *in vivo* (102). Par ailleurs cette fonction pro-survie a suggéré que les NLC puissent participer aux mécanismes d'échappement immunitaire actifs dans le microenvironnement tumoral.

Les NLC expriment le CD14, marqueur des monocytes, et des marqueurs des macrophages de type M2 : le CD68, le CD163 et le CD206 (103), elles présentent également des marqueurs de cellules stromales, tel que la vimentine et STRO-1.

Ces cellules produisent aussi le SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor 1), une chimiokine qui est normalement sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse (86), ainsi que le CXCL13, chimiokine normalement sécrétée par les FDC dans les ganglions lymphatiques (48). Les NLC présentent quasiment tous les marqueurs des TAM, elles sont caractérisées par une forte production de TGF- β , d'IL-10, de CCL17 et de CCL22 (102), (104). Elles peuvent également produire du VEGF (105), ainsi que l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme, impliquée dans le métabolisme du tryptophane connue pour moduler l'activation et la prolifération des lymphocytes T (104).

Les NLC expriment le CD163, une protéine transmembranaire appartenant à la famille des Scavenger, et codée par un gène situé sur le chromosome 12p13. Elle possède un domaine extracellulaire de 1048 d'acides aminés, un segment transmembranaire et une queue cytoplasmique avec plusieurs variantes d'épissage (106).

Le CD163 est exprimé à la surface de nombreuses cellules tels que les monocytes, d'autres cellules myéloïdes, les cellules de Kupffer et les macrophages de la rate et du thymus (107).

Le CD163 a des fonctions dans la clairance de l'hémoglobine, les réponses anti-inflammatoires et la régulation de l'érythropoïèse. Le CD163 se fixe sur le complexe formé par l'haptoglobine (Hp) et l'hémoglobine (Hb) issus de l'hémolyse, ce qui provoque l'endocytose du complexe par les macrophages et la production d'IL-10 (108). Le CD163 est récupéré pour être recyclé tandis que le complexe Hb-Hp sera dégradé libérant ainsi le fer et du monoxyde de carbone (CO) qui ont aussi des propriétés anti inflammatoires (109).

L'expression du CD163 à la surface des cellules est fortement augmentée par des médiateurs anti-inflammatoires tels que les corticoïdes, l'IL-6 et l'IL-10 (110). Par conséquent, les macrophages exprimant le CD163 sont les plus abondants lors des phases de résolution de l'inflammation (111).

Il existe aussi une forme soluble du récepteur dans le plasma sanguin, appelée sCD163. Elle dérive du domaine extracellulaire par clivage au niveau du segment transmembranaire assuré par les métalloprotéinases (107).

Le CD163 est activé dans de nombreuses pathologies présentant une phase inflammatoire, par exemple la cirrhose, le diabète de type 2, le syndrome d'activation macrophagique, la maladie de Gaucher, le sepsis, le SIDA, la polyarthrite rhumatoïde ou encore le lymphome de Hodgkin (112).

Il est intéressant de noter que sa concentration est augmentée dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante caractérisées par un déséquilibre entre effecteurs pro et anti-inflammatoires (113), (114).

Le CD163 est aussi décrit comme fixant la paroi bactérienne. Suite à cette fixation, on observe une production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α ce qui contribue donc à l'initiation de la réponse inflammatoire (115).

Le CD163 a été décrit comme le marqueur le plus spécifique de NLC. En particulier, son expression a été corrélée avec la prolifération des cellules de LLC dans les ganglions. De plus, des taux élevés de la forme soluble de CD163 ont été liées à un pronostic défavorable de la maladie (116).

Une fréquence importante des macrophages CD68+ CD163+ a été également associée à un mauvais pronostic dans le mélanome cutané (117), et dans des sarcomes humains et murins (118).

Fonctions des NLC

Les NLC ont été décrites jouer un rôle important dans la protection contre l'apoptose des cellules leucémique *in vitro* (86).

Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce mécanisme, notamment le CXCL12 qui augmente la survie des cellules leucémiques via l'activation d'AKT et ERK et l'augmentation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 suite à sa liaison au récepteur CXCR4 (119).

Les NLC secrètent les facteurs BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A proliferation-inducing ligand), également impliqués dans la survie des lymphocytes B via l'activation de la voie canonique de NF-KB qui induit une surexpression de Mcl-1 dans la cellule tumorale (120).

Les NLC sont aussi capables de produire de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) qui prolonge la survie des cellules B leucémiques en interagissant avec son récepteur, c-MET. L'HGF favorise non seulement la survie des cellules B leucémiques mais aussi il permet de maintenir le phénotype M2 des NLC qui expriment également le récepteur c-MET (104).

Trafic des cellules dans les niches ganglionnaires

Les NLC secrètent de nombreuses cytokines et chimiokines participant ainsi au trafic ganglionnaire des cellules B de LLC, notamment le CXCL13 normalement sécrété par les FDC et qui permet le recrutement des lymphocytes B dans les follicules (121).

La sécrétion de CXCL12 joue également un rôle mais plutôt dans le contrôle de la sortie des lymphocytes des ganglions. Sa liaison au récepteur CXCR4 exprimé à la surface des cellules B leucémiques (122), induit une diminution du S1PR (sphingosine 1 phosphate receptor 1) et donc une augmentation de la rétention des cellules B dans le ganglion (123) La diminution du récepteur S1PR permet également aux lymphocytes B de LLC de rester en contact avec les NLC ce qui favorise leur survie (123)

Inhibition de la réponse immunitaire

Plusieurs études ont montré l'implication des NLC dans l'échappement tumoral à la surveillance immunitaire. Une étude transcriptomique et protéomique a montré dans les surnageants des cultures des NLC la présence de nombreuses cytokines normalement produites par les macrophages M2 dans une situation physiologique. Notamment les TGFb, IL10, CCL17, CCL22 et IDO exprimés favorisent l'expansion des lymphocytes Treg, et par voie de conséquence diminuent les proportions de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (103).

De plus, les NLC induisent une augmentation de l'expression de PD-1 dans les lymphocytes T et initient donc des signaux inhibiteurs de la réponse des cellules T (124).

Recrutement et différenciation

Sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles observées dans ces études in vitro, les NLCs sont considérées comme les TAMs de la LLC. Les cellules CD14⁺ exprimant le CCR2 sont ainsi recrutées dans les ganglions via le CCL2 produit par les lymphocytes B de LLC après leur stimulation par le CD40L exprimé par les lymphocytes T (**Figure 16**) (125).

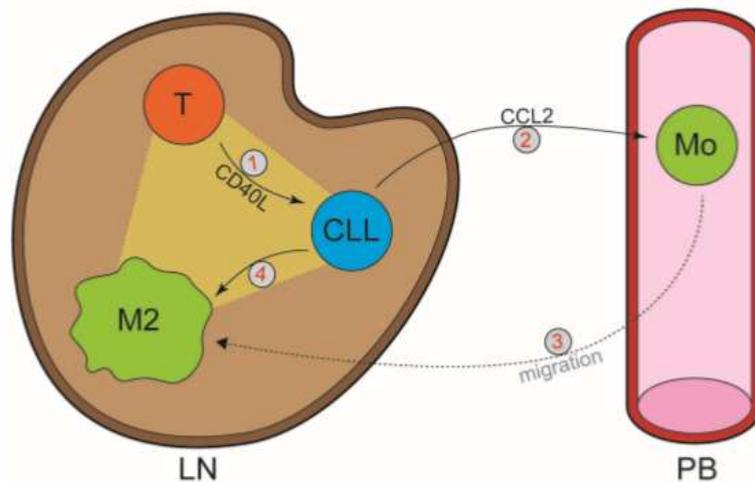


Figure 16 : Modèle de recrutement des monocytes dans les ganglions de LLC.

La stimulation des cellules de LLC par le CD40L (1) exprimé par les cellules T activées induit leur sécrétion de CCL2 (2), ce qui permet le recrutement des monocytes dans les ganglions lymphatiques (LN) (3). Les facteurs sécrétés par les cellules B induisent alors la différenciation des monocytes en macrophages M2 (4). Mo: monocyte; PB: sang périphérique ; LN : Ganglion lymphatique (125)

Après leur entrée dans le ganglion, ces monocytes peuvent se différencier en NLC grâce à la présence de plusieurs facteurs sécrétés par les cellules leucémiques (126).

Ce mécanisme a été mis en évidence dans une étude *in vitro*, qui a montré que des monocytes CD14⁺ issus de sujets sains étaient capables de se différencier en NLC lorsqu'ils sont mis en culture pour quatorze jours avec des lymphocytes B issus de patients LLC (126). Cependant, le profil transcriptomique des NLC obtenues à partir de monocytes de patients LLC est différent de celui des NLC obtenus à partir des monocytes de donneurs sains, notamment au niveau des facteurs impliqués dans les fonctions phagocytiques et pro-inflammatoires (127).

Parmi les facteurs sécrétés par les cellules leucémiques la protéine HMGB1 (soluble high mobility group box 1) après liaison aux récepteurs RAGE (receptor for advanced glycation end products) et TLR9 (récepteur Toll-like-9), exprimés à la surface des monocytes, induit leur différenciation *via* l'activation de STAT-3 et de NF-K (128). De plus les taux de sHMGB1 soluble, sont significativement

augmentés dans le sérum des patients atteints de LLC, par rapport aux témoins sains.

Après différenciation les NLC contribueront à la rétention des cellules B leucémiques dans le ganglion et favoriseront ainsi leur survie.

En conclusion, les cellules leucémiques attirent dans le ganglion les monocytes et induisent leur différenciation en NLC. Les NLC à leur tour, favorisent la rétention et la survie des cellules leucémiques (Figure 17).

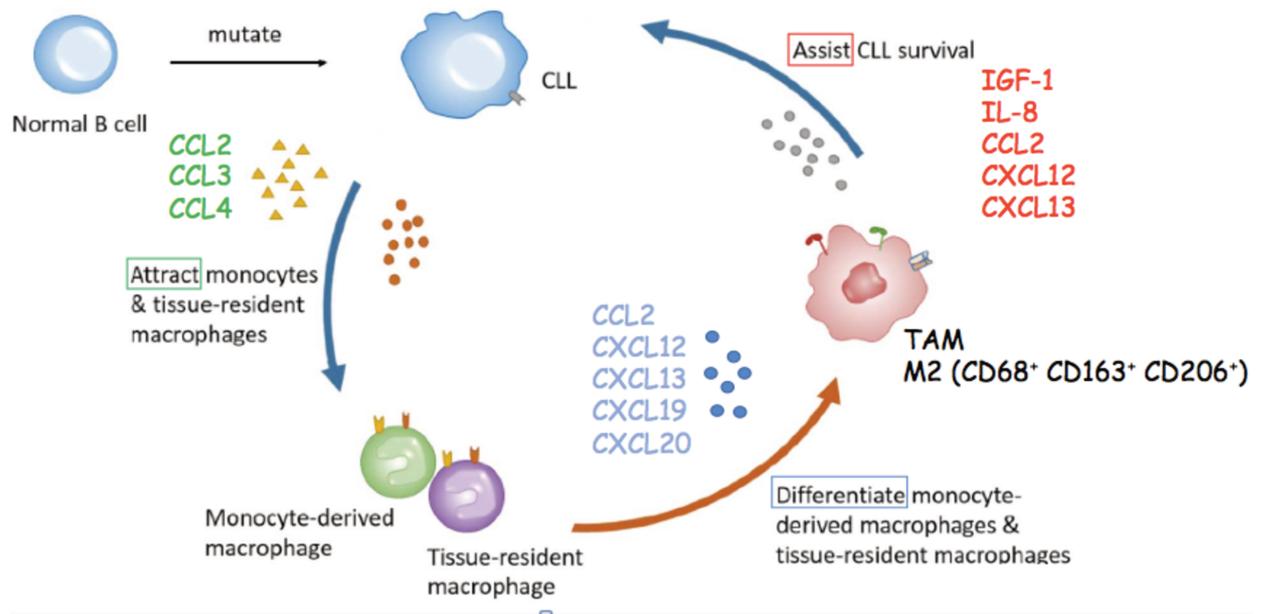


Figure 17 : NLC sont les TAM de LLC. Modifiée d'après (128).

Objectif de la thèse

Plusieurs études dont certaines du laboratoire ont montré que les ganglions lymphatiques sont un site de rétention des cellules tumorales. Le microenvironnement dans ces sites sanctuaires joue un rôle essentiel dans la survie et la prolifération des lymphocytes tumoraux.

La structure très organisée des ganglions non tumoraux est profondément altérée dans les ganglions de patients atteints de LLC, ce qui conduit à l'altération du dialogue entre les lymphocytes B et les cellules du microenvironnement. Malgré le développement de différents agents thérapeutiques visant ces interactions, la pathologie reste incurable et les résistances aux traitements sont fréquentes.

Il est donc important de mieux comprendre et caractériser la désorganisation observée dans les ganglions de LLC qui conduit au trafic altéré des lymphocytes tumoraux afin d'identifier de possibles cibles thérapeutiques complémentaires.

De plus, l'influence du microenvironnement tumoral de la LLC, notamment des TAM, reste encore peu étudiée. Les mécanismes par lesquels les interactions fonctionnelles entre les NLC (qui semblent être les TAM de la LLC) et les cellules leucémiques, ne sont pas encore complètement décrits.

Les objectifs de ma thèse se répartissent sous deux grands axes :

1- L'établissement d'une cartographie des structures ganglionnaire altérées chez les patients atteints de LLC. Mon approche a été de comparer l'organisation structurale des ganglions issus de patients atteints une LLC à celle de ganglions non tumoraux.

2- La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules CD68⁺ dont l'augmentation significative de ces cellules dans les ganglions de patients atteints de LLC a été mise en évidence lors de l'établissement de la cartographie et qui pourraient se substituer aux cellules stromales ganglionnaires dans le dialogue entre les cellules tumorales et le microenvironnement.

Résultats

Article : Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells are an alternative source of CCL21 homeostatic chemokine in disorganized lymph node

Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), comme dans tous les cancers le dialogue entre la cellule tumorale et son microenvironnement joue un rôle majeur dans la survie et la prolifération des cellules tumorales. Différentes publications ont montré le rôle que le microenvironnement ganglionnaire pouvait jouer dans l'accumulation des cellules de LLC au sein des organes lymphoïdes via des signaux de survie et de prolifération mais peu d'études ont évalué les modifications structurelles de la micro anatomie du ganglion tumoral dans la LLC.

Dans cette étude, nous avons établi une cartographie détaillée du ganglion lymphatique de LLC par une double approche d'immunohistochimie et de immunofluorescence. Cela nous a permis de confirmer la désorganisation de son architecture, caractérisée par une infiltration diffuse des lymphocytes B tumoraux exprimant le récepteur CCR7 de façon constitutive, une perte de la structuration des zones corticales folliculaires et paracorticales due à la disparition des cellules dendritiques folliculaires (FDC), et une désorganisation du réseau des cellules réticulaires fibroblastiques (FRC). Nous avons mis en évidence dans les ganglions provenant de patients atteints de LLC, la présence de nombreuses cellules positives à la fois pour le CD68 et pour le CCL21, ligand de CCR7. Pour mieux comprendre le rôle des ces macrophages CD68⁺ nous avons utilisé un système qui permet de différencier *in vitro* des cellules CD68⁺, les *Nurse-Like Cells* (NLC), à partir de PBMC issus de patients atteints de LLC. Nous avons montré que ces cellules expriment l'ARN messager et la protéine de la chimiokine CCL21 par une méthode de détection basée sur la cytométrie en flux en images. Ces résultats suggèrent que les cellules CD68⁺ peuvent représenter une source supplémentaire de CCL21 habituellement secrété par les FRCs dans le ganglion. Nous avons pu montrer également que CCL21, une fois secrété par les cellules CD68⁺, reste fixé à leur membrane et attire ensuite les cellules B exprimant le CCR7. Ces résultats suggèrent

un rôle de ces cellules CD68⁺ dans la rétention des lymphocytes B dans les ganglions.

Ce manuscrit est actuellement soumis pour publication a la revue Haematologica.

Résultats supplémentaires

1. Cartographie des ganglions de LLC

Afin de mieux comprendre les altérations du microenvironnement ganglionnaire chez les patients atteints de LLC, j'ai commencé par étudier la répartition des principales cellules stromales du ganglion notamment les FDCs et le FRCs, par une première approche en immunohistochimie enzymatique simple en comparant une série de ganglions tumoraux à des ganglions non tumoraux.

Cette étude a été réalisée sur des coupes tissulaires formolées incluses en paraffine qui permettent une meilleure analyse topographique que sur des petits fragments congelés voire sur des micro biopsies.

Cette étude a permis de révéler une désorganisation de l'architecture ganglionnaire dans les échantillons de LLC avec notamment : une infiltration diffuse des lymphocytes B tumoraux, une perte de la structuration des zones corticales folliculaires et para corticales due à perte plus au moins complète du réseau des FDCs et une désorganisation du réseau des FRCs qui apparaît disloqué avec des cellules allongées ou étoilées dispersées. Ces résultats sont présentés dans la figure 1 de l'article.

Les FRC ont été identifiées par le marqueur α -SMA (actine du muscle lisse) qui est le plus adapté pour l'approche d'immunohistochimie. Pour la suite de mes analyses par immunofluorescence, j'ai utilisé l'anticorps ERTR7 qui reconnaît une composante intracellulaire des fibroblastes et qui est le plus utilisé dans cette approche.

Les FDC sont identifiables par les marqueurs CD21 et CD23 : pour mon approche j'ai décidé d'utiliser le CD21 car les lymphocytes B de LLC expriment le CD23.

Le marquage d'une coupe de ganglion non tumorale avec l'anticorps anti-CD23 est localisé au niveau du follicule et correspond aux FDC. En revanche, dans une coupe de ganglion de LLC j'ai pu observer un marquage très diffus qui pourrait correspondre aux lymphocytes B infiltrés (Figure 18).

L'utilisation de l'anticorps anti-CD21 spécifique uniquement pour les FDC a confirmé ces observations (figure 1 de l'article).

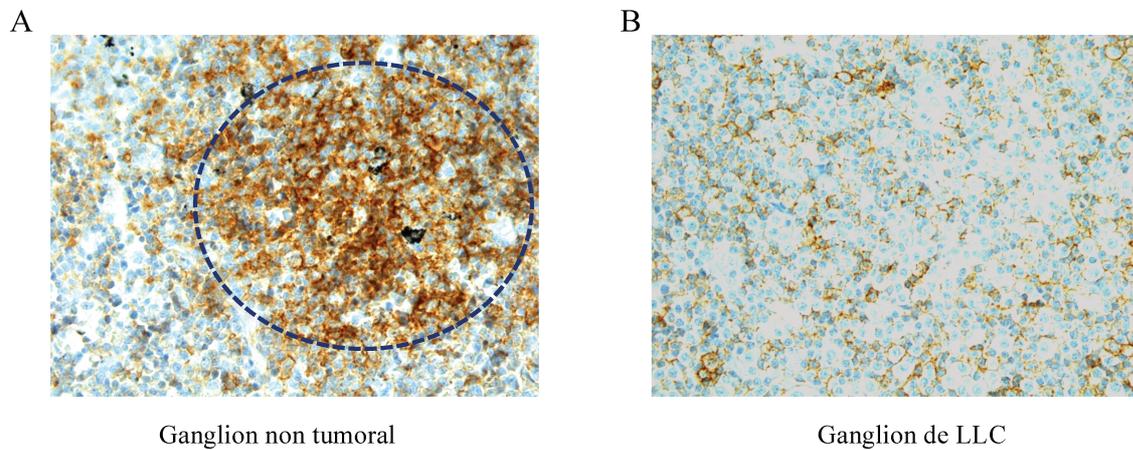


Figure 18: Immunomarcage avec l'anticorps anti-CD23 sur des coupes ganglionnaires. Image en lumière blanche (A) Marquage du réseau de FDC dans un follicule de ganglion non tumoral (B) Marquage hétérogène de la population lymphoïde tumorale au sein d'un ganglion de LLC. Les images ont été acquises avec un microscope Leica DFC300 DM2000 (n=10), (X400).

2. Expression du CCR7 par les lymphocytes B de LLC:

Compte tenu du rôle joué par les récepteurs des chimiokines dans les processus de migration et de localisation des lymphocytes dans le ganglion, nous avons vérifié l'expression du récepteur CCR7 à la surface des lymphocytes B. Ce récepteur essentiel au trafic des lymphocytes T pourrait avoir un rôle important dans le dialogue entre les cellules tumorales et le microenvironnement dans la LLC.

Cette étude a été réalisée par deux approches :

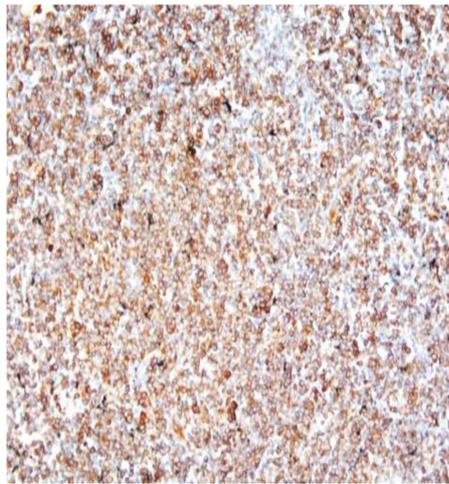
1- L'immunohistochimie et immunofluorescence sur des coupes tissulaires incluses en paraffine qui permettent d'analyser l'expression du CCR7 exprimé à la surface des lymphocytes B du ganglion.

2- La cryométrie en flux permettant d'étudier l'expression des récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes B de la phase circulante.

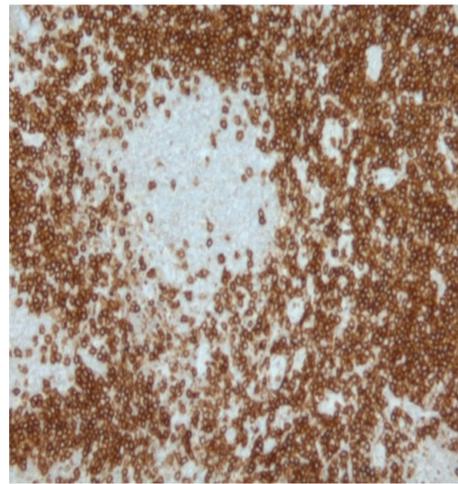
L'étude immunohistochimique a confirmé une expression diffuse du récepteur CCR7 dans le ganglion de LLC par de nombreuses cellules qui peuvent correspondre à des lymphocytes B infiltrés. En revanche dans un ganglion non tumoral, le CCR7 est exprimé essentiellement dans la zone T, à l'extérieur des follicules (Figure 19A)

Par la technique d'immunofluorescence, le double marquage CCR7 et CD20 a permis de confirmer la localisation de CCR7 et de CD20 à la membrane des cellules tumorales dans un ganglion de LLC (Figure 19B).

A



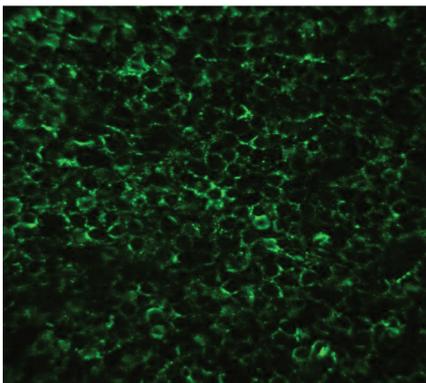
Ganglion de LLC



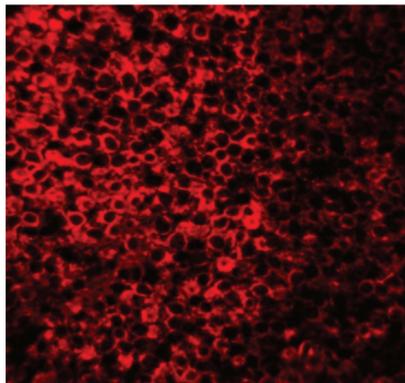
CCR7

Ganglion non tumoral

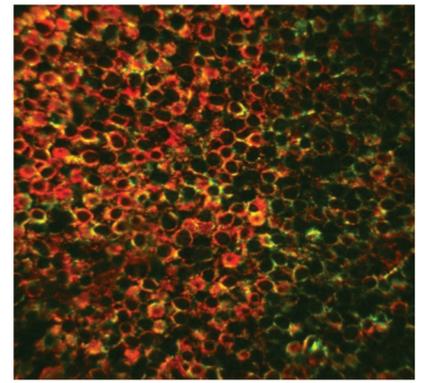
B



CD20



CCR7



CD20 CCR7

Figure 19: Expression de CCR7 par les lymphocytes B de LLC. (A) Image représentative d'un marquage CCR7 par immunohistochimie réalisé sur un ganglion de LLC montrant un marquage diffus et d'un ganglion non tumoral montrant une population périfolliculaire positive entourant un petit follicule négatif (X200). Les images ont été acquises avec un microscope Leica DFC300 DM2000 en lumière blanche (B) Image représentative d'une coupe d'un ganglion lymphatique issue d'un patient LLC, marqué avec les anticorps anti-CD20 (vert) et anti-CCR7 (rouge). La superposition des deux marqueurs est représentée en jaune (X400). Les images ont été acquises avec un microscope confocal spinning Disk Leica DMI6000 (n=10).

L'expression de ce récepteur de surface a également été évaluée par cytométrie en flux sur les lymphocytes B circulants purifiés à partir du sang périphérique de patients atteints de LLC.

J'ai analysé en particulier la population cellulaire tumorale CD19⁺ CD5⁺. Le marqueur CD5, normalement exprimé par les lymphocytes T, est exprimé de façon aberrante par les cellules B malignes.

Après purification par tri magnétique, les cellules B ont été marquées avec les anticorps anti-CD19, -CD5 et anti-CCR7 et analysées.

L'analyse des lymphocytes B de 14 patients a confirmé la forte fréquence de la population CD19⁺ CD5⁺ (82,77 % en moyenne) et également la forte expression du CCR7 (89,77% en moyenne) dans cette population (Figure 20)

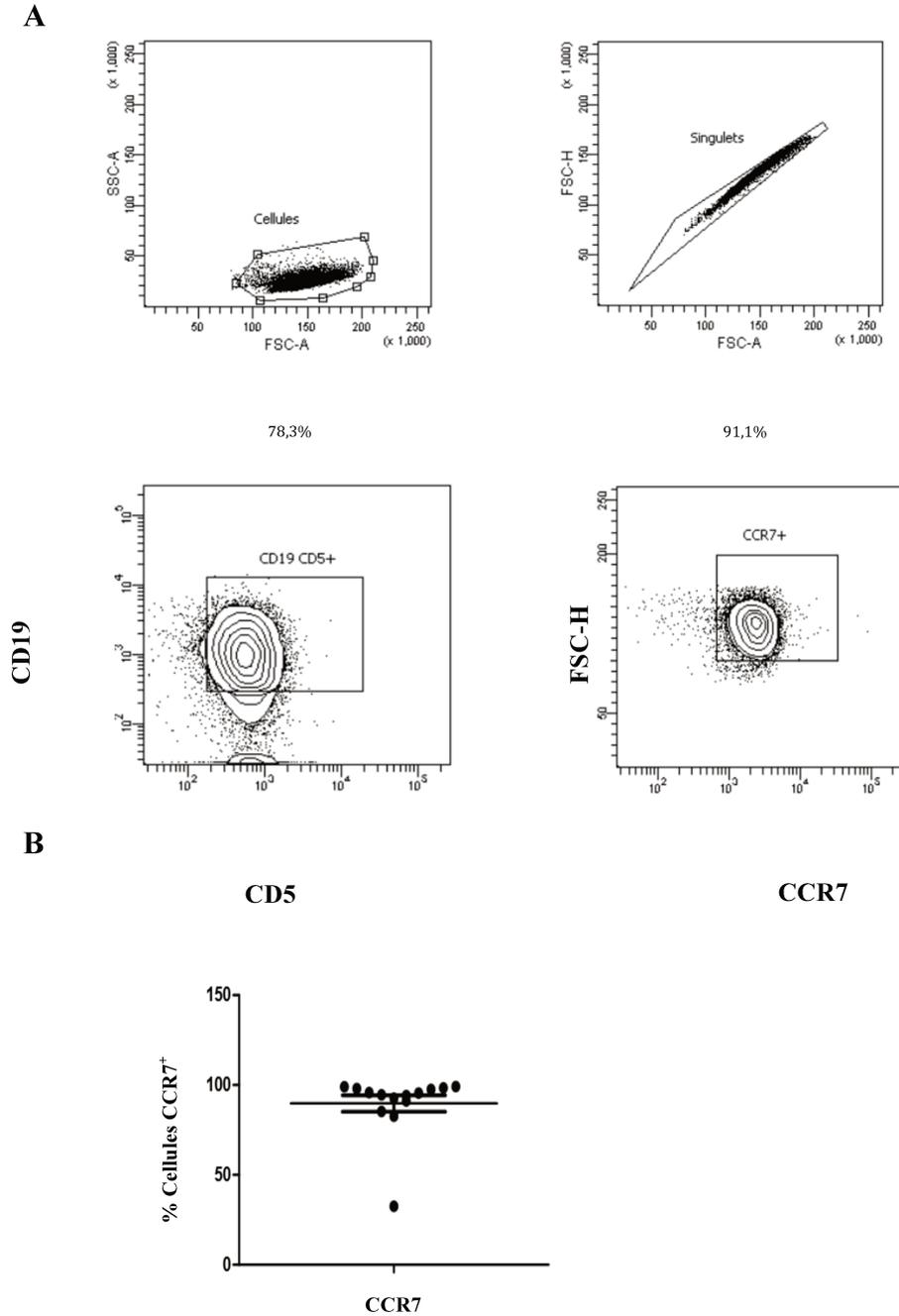


Figure 20: Expression de CCR7 par les lymphocytes B de LLC. Analyse par cymométrie en flux des lymphocytes B purifiés et marqués par les anticorps anti CD19, -CD5, -CCR7. Le panel **A** montre une analyse représentative de l'expression de CCR7 à la surface des cellules CD19⁺CD5⁺. Le panel **B** représente les pourcentages d'expression de CCR7 à la surface des lymphocytes B CD19⁺CD5⁺ des différents patients de LLC (n=14). L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide d'un cymomètre Canto II et du logiciel DIVA (BD Bioscience).

3. Expression de CCL21 par les NLCs

De façon très intéressante, lors de l'établissement de la cartographie, nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre de cellules positives pour le marqueur des macrophages tissulaires CD68 dans les échantillons tumoraux. (Résultats figures 2 et 3 d'article) et qui sont également positives pour la chimiokine CCL21.

La question majeure était ainsi de confirmer si ces cellules produisent du CCL21.

Une approche potentielle implique la détection de l'ARN et de la protéine après tri cellulaire de ces cellules à partir des ganglions. Cependant, il est très difficile d'obtenir des tissus tumoraux frais. J'ai ainsi utilisé le système de différenciation *in vitro* qui permet de différencier *in vitro* des cellules adhérentes CD68⁺ à partir de PBMC issus de patients LLC (128). Après 14 jours de culture de PBMC de patients de LLC, nous obtenons des cellules adhérentes de grandes tailles entourées de cellules de petite taille (Figure 21).

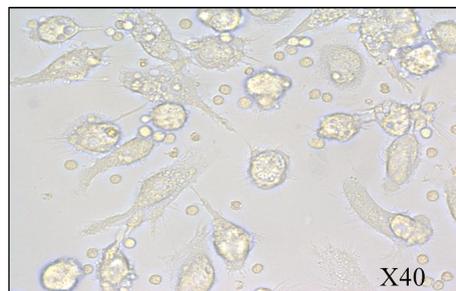


Figure 21: Différenciation *in vitro* de NLCs. Image représentative des cellules adhérentes obtenues après de 14 jours de culture de PBMC d'un patient atteint de LLC. L'image a été acquise avec un microscope Zeiss axio Observer D1, (X400).

Dans un premier temps, j'ai décidé de détecter l'ARN de CCL21 par des approches de RT-PCR et qPCR qui se sont révélées cependant non adaptées à ce système. Le nombre de cellules obtenu après différenciation était très variable et souvent insuffisant pour obtenir une quantité d'ARN suffisante pour assurer des résultats reproductibles.

De plus, malgré des lavages intensifs et répétés, la persistance de cellule de petite taille dans la population cellulaire lysée pouvant empêcher de cibler la détection de l'ARN de CCL21 spécifiquement dans les cellules adhérentes

J'ai ainsi utilisé une nouvelle approche de détection de l'ARN basée sur la cytométrie en flux (Prime Flow RNA). Cette technique utilise l'hybridation in situ en fluorescence en combinaison avec l'immunophénotypage des marqueurs membranaires (Figure 22). Elle permet ainsi de cibler la détection d'ARN dans des sous-populations cellulaires spécifiques très faiblement représentées.

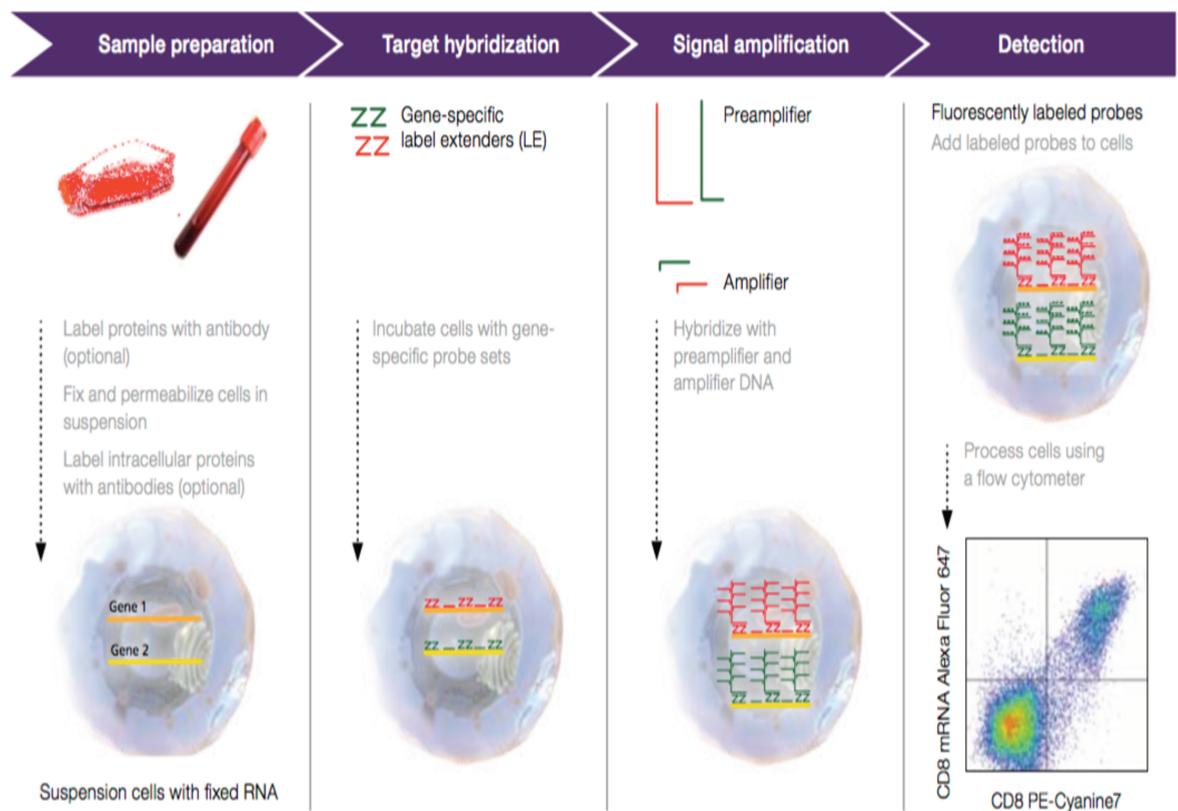


Figure 22 : Principe de la technique RNA Primeflow. Etapes de la technique: marquage extracellulaire, fixation et perméabilisation, marquage intracellulaire, hybridation de la d'ARN cible avec un ensemble de sondes spécifiques contenant 20 à 40 paires d'oligonucléotides. L'amplification du signal est ensuite déterminée lors d'une série d'hybridation des préamplificateurs, amplificateurs et des oligonucléotides conjugués à un fluorochrome.

En parallèle à l'expression de l'ARNm de CCL21 j'ai analysé comme contrôle celle de l'ARNm de CXCL13 qui a été démontrée dans les NLC (48) . Dans toutes les expériences, j'ai utilisé comme contrôle interne la sonde RPL13 spécifique pour l'ARNm de la protéine ribosomale L13 qui est exprimé par toutes les cellules.

Dans un premier temps, j'ai mis à point la technique de *RNA PrimeFlow* dans la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB231 qui exprime de façon constitutive l'ARNm CCL21 et CXCL13 (128).

J'ai pu détecter l'ARNm de CXCL13 ainsi que de CCL21 dans environ 80% de ces cellules qui sont 100% positives pour l'expression du gène de ménage RPL13 (Figure 23).

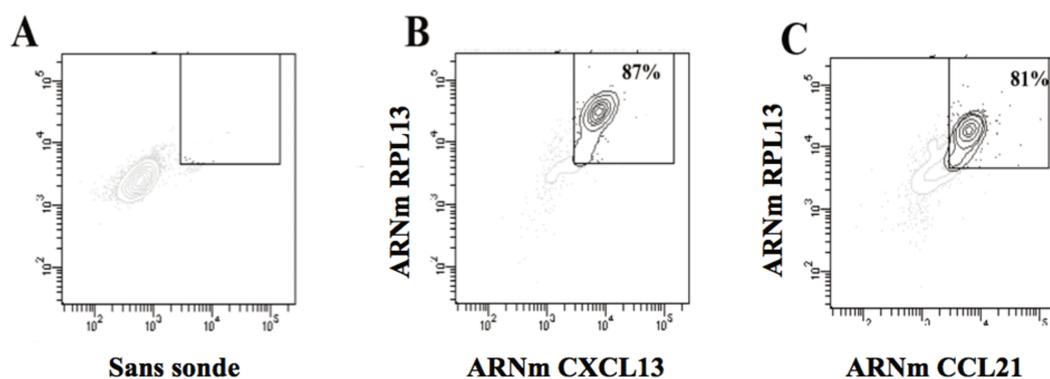


Figure 23: Détection de l'ARNm de CXCL13 et CCL21 dans la lignée cellulaire MDA-MB231. Analyse par cytométrie en flux des cellules MDA-MB231 après hybridation avec les sonde spécifiques CXCL13 et RPL13 (B), ou CCL21 et RPL13 (C). Le panel A représente le contrôle, sans sondes.

Après 14 jours de culture de PBMC, provenant des patients atteints de LLC, j'ai récupéré les cellules adhérentes qui ont été marquées avec les anticorps anti-CD19, -CD3, -CD56 et anti-CD68, afin d'exclure les lymphocytes B, T et les cellules NK qui restent accrochées aux cellules CD68⁺ (NLCs).

J'ai pu observer de façon reproductible qu'environ 90% des cellules CD68⁺ étaient CD19/CD3/CD56 positives. Cette population doublement positive pour les marqueurs des NLCs et des lymphocytes correspond très vraisemblablement à des agrégats entre ces types cellulaires qui persistent malgré les lavages. J'ai pu détecter l'expression de l'ARNm de CCL21 et de CXCL13 dans la population CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁻ ainsi que dans la population CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁺ (Figure 24)

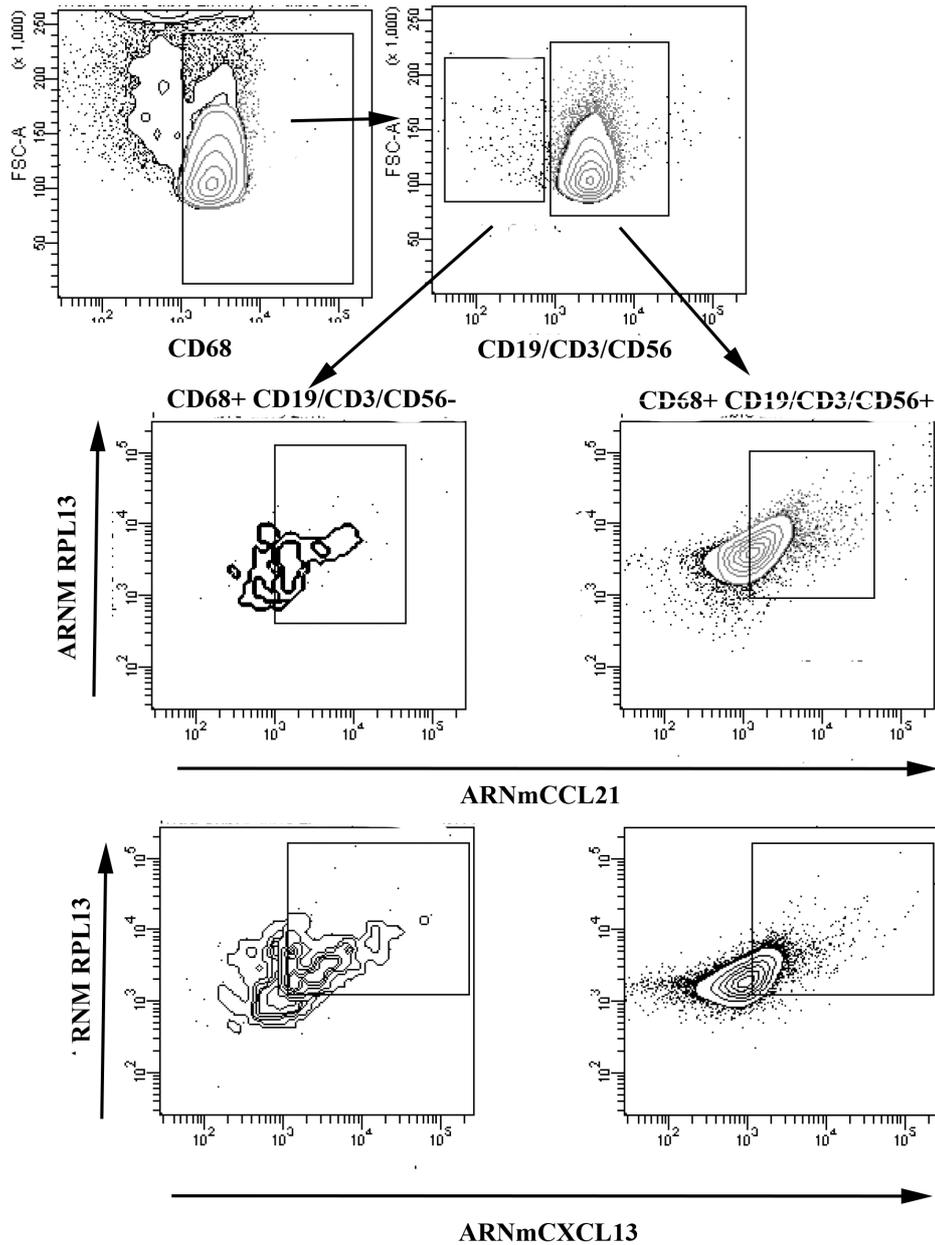


Figure 24 : Les macrophages CD68⁺ expriment le CCL21. Analyse de l'expression de l'ARNm de CCL21 et de CXCL13, par cytométrie en flux. Les cellules adhérentes ont été marquées par les anticorps anti-CD3, -CD19, -CD56 et anti-CD68 et les sonde CCL21, CXCL13 et RPL13. **(A)** Expression de l'ARNm de CXCL13 et RPL13 dans les cellules CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁻ (gauche) et dans les cellules CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁺ (droite). **(B)** Expression de l'ARNm de CXCL13 et RPL13 dans les cellules CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁻ (gauche) et dans les cellules CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁺ (droite).

Afin de cibler la détection de l'ARN de CCL21 spécifiquement aux cellules CD68⁺ présentes dans les agrégats, j'ai analysé les cellules provenant de la suspension de cultures.

Dans cette population, seulement un faible pourcentage était doublement positif et il contenait vraisemblablement des agrégats décrochés lors de la récupération des cellules.

J'ai pu détecter l'ARN de CCL21 seulement dans la fraction CD68⁺ ce qui a confirmé que seulement les cellules CD68⁺ produisent cet ARN (Figure 25).

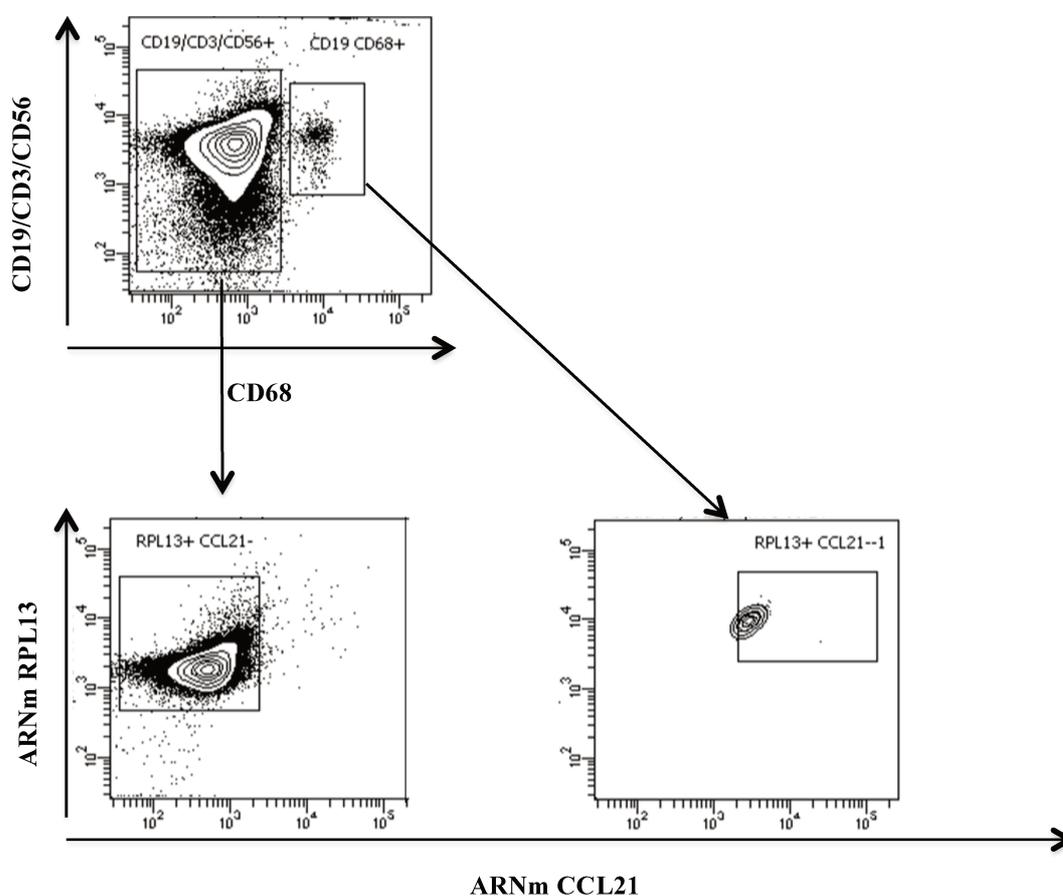


Figure 25: Les cellules en suspension n'expriment pas le CCL21. Analyse de l'expression de l'ARNm de CCL21 par cytométrie en flux. Les cellules en suspension ont été marquées par les anticorps anti-CD3, -CD19, -CD56 et -CD68 et avec les sondes CCL21 et RPL13. Expression de l'ARNm de CCL21 et RPL13 dans les cellules CD68⁻ CD19/CD3/CD56⁺ (gauche) et dans les cellules CD68⁺ CD19/CD3/CD56⁺ (droite)

Au vue de ces résultats j'ai voulu coupler l'approche de détection de l'ARN par cytométrie à la technique de cytométrie en imagerie qui a permis de visualiser les interactions cellulaires et de cibler la détection de l'ARN et aussi de la protéine CCL21 de façon très spécifique dans les cellules NLCs. (résultats présentés dans l'article).

Discussion

1. Désorganisation de l'architecture ganglionnaire

La LLC est une hémopathie caractérisée par une accumulation de cellules B clonales CD19⁺ CD5⁺ dans les organes lymphoïdes. Il existe deux sites potentiels de prolifération intra tissulaire des cellules de LLC chez le patient: la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. Des études indiquent que les ganglions constitueraient des sites préférentiels de prolifération et d'accumulation des cellules de LLC (38).

Différentes publications ont montré le rôle que pouvait avoir le microenvironnement ganglionnaire dans l'accumulation des cellules de LLC au sein des organes lymphoïdes via des signaux de survie et de prolifération mais peu d'études ont évalué les modifications structurelles de la micro anatomie du ganglion tumoral dans ce modèle pathologique.

Ainsi nos données immunohistochimiques sur des coupes tissulaires des ganglions tumoraux ont confirmé une désorganisation du réseau des principales cellules stromales avec une redistribution des acteurs du microenvironnement. Ce remodelage, via l'interaction de chimiokines et de leurs récepteurs, pourrait modifier le dialogue entre les cellules B et le microenvironnement et certainement favoriser une rétention accrue des cellules B clonales de la LLC (129).

Certains auteurs supposent un rôle pro-tumoral des FDCs, et leur implication dans le homing et la rétention des cellules leucémiques dans les tissus résidents (45). Une autre étude dans un modèle murin suggère un dialogue entre cellules leucémiques et les FDCs, permettant la progression de la LLC en contribuant au positionnement des cellules de LLC dans les centres de proliférations (130). Il n'existe pas d'étude claire prouvant néanmoins la présence des FDCs, en dehors de vrais follicules résiduels, au sein de l'infiltrat tumoral ganglionnaire des patients atteints de LLC. Nos résultats témoignent au contraire d'une absence des FDCs y compris au niveau des centres de prolifération. Si nous avons néanmoins observé des cellules non lymphoïdes positives pour CXCL13 sur notre série de ganglions de patients atteints de LLC, il n'est pas certain qu'elles correspondent à de véritables FDCs. Ces cellules positives pour le CXCL13 pourraient être des NLC CD68⁺ comme elles ont été décrites par l'équipe de *Bürkle et al* (48). Nous avons identifié ces FDC

dans notre travail à l'aide d'anticorps anti-CD21 et anti-CD23 sur des coupes en paraffine. Un défaut de sensibilité n'est pas impossible et cette analyse mériterait d'être complétée sur des coupes en congélation avec d'autres marqueurs potentiels des FDCs comme le CD35 ou la caldesmone. Les coupes à partir de petits fragments congelés limitent toutefois l'appréciation topographique du microenvironnement par leurs faibles surfaces analysées (131). Par ailleurs s'il persiste des FRCs marqués à l'anti α -SMA (actine du muscle lisse), le réseau habituel apparaît nettement disloqué. Pourtant en simple marquage, notre étude retrouve des cellules du microenvironnement, relativement nombreuses, exprimant le CCL21. Avant de connaître le lien avec des FRCs résiduels ou avec d'autres populations cellulaires, cette donnée est importante s'agissant du ligand de CCR7 exprimé de façon constitutive par les cellules B de LLC.

2. Modifications du microenvironnement ganglionnaire

Parmi les cellules du microenvironnement potentiellement impliquées dans notre modèle, nous nous sommes focalisé sur les macrophages car en effet nous avons montré une densité de cellules CD68⁺ significativement plus élevée dans les ganglions de LLC que dans les ganglions non tumoraux. Ces cellules ayant de plus une répartition assez comparable avec la population de cellules CCL21 positives. Notre hypothèse est que ces cellules CD68⁺ pourraient correspondre aux TAM de LLC.

L'étude par double marquage en immunofluorescence a montré pour la première fois une co-localisation de CCL21 et CD68 sur la même population cellulaire. L'hypothèse que cette population puisse se substituer aux FRCs dans les ganglions de LLC est appuyée par le fait que les FRC doublement ERTR7 et CCL21 positives sont dispersées par rapport à ce qui est observé dans les ganglions non tumoraux. Ces résultats suggèrent donc que les cellules CD68⁺ peuvent représenter une source supplémentaire de CCL21 habituellement secrété par les FRCs dans le ganglion. Nous avons prouvé la production spécifique de CCL21 en détectant l'ARNm et la protéine CCL21 dans des cellules CD68⁺ obtenues par différenciation *in vitro* de PBMC issus des patients atteints de LLC(117).

Ce système de différenciation *in vitro* nous a permis de remplacer notre manque d'accessibilité aux tissus tumoraux frais. Nous aurions voulu confirmer ce

résultat sur des cellules CD68 triées à partir des biopsies ganglionnaires des patients atteints de LLC, mais malheureusement les biopsies sont très rarement réalisées, donc la suite de nos travaux a été réalisée sur les NLC différenciées *in vitro*, qui peuvent être la contrepartie *in vivo* des NLC.

L'analyse phénotypique des cellules différenciées *in vitro* a montré une hétérogénéité d'expression de CD163, un marqueur spécifique des macrophages M2. De façon intéressante une partie des cellules CD68⁺ CD163⁻ expriment seulement l'ARNm de CCL21. Ce résultat suggère un degré différent de différenciation de cellules CD68⁺ identifiables par ce marqueur.

Le CD163 a été proposé comme le marqueur le plus adapté pour l'identification des NLC, au vue de la corrélation observée entre le degré d'infiltration ganglionnaire par les NLC CD163⁺ et la progression de la maladie. Également, une proportion plus élevée de macrophages CD68⁺ CD163⁺ était associée à un mauvais pronostic dans les mélanomes cutanés (117), et dans les sarcomes humains et murins (118).

De plus, le taux de CD163 soluble (sCD163) relargué par les NLC et détecté dans le sang des patients atteints de LLC, est corrélé à des marqueurs de mauvais pronostic tels que le statut IgHV non muté (132).

Par immunohistochimie nous avons observé une forte présence des cellules CD163⁺ dans les ganglions de LLC (Figure 26), ce qui nous suggère d'évaluer la densité des cellules CD68⁺ CD163⁺ CCL21⁺, et voire s'il y'a une corrélation entre la densité des cellules CD163 exprimant le CCL21 et le stade de la maladie.

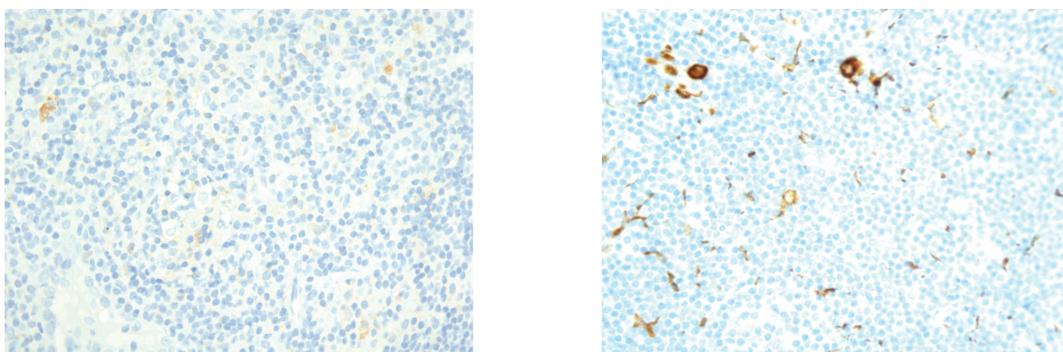


Figure 26 : Immunomarquage avec l'anticorps CD163 sur une coupe de ganglion (A) non tumoral et d'un ganglion d'un patient atteint de LLC (B) (X400).

Grâce aux techniques de la cytométrie en flux en images et à la microscopie confocale, nous avons pu détecter la protéine CCL21 à la membrane des cellules NLC différenciées *in vitro* non perméabilisées ce qui suggère qu'elle pourrait être retenue après sa sécrétion. Par ailleurs le CCL21 a une extrémité C-terminale qui lie les glycosaminoglycanes (GAG) qui permettraient son immobilisation sur la matrice extracellulaire ou à la surface de la cellule (133).

Cela suggère que le CCL21, une fois sécrété par les cellules CD68⁺, reste fixé à leur membrane et attire ensuite les cellules B exprimant le CCR7. Cela pourrait probablement expliquer la forte interaction entre les macrophages et les cellules B qui restent accrochés aux cellules CD68 malgré les lavages. En faveur de notre hypothèse, nous avons observé qu'une proportion importante de cellules CD68⁺ exprime le récepteur CCR7, ce qui suggère que le CCL21 pourrait être retenu à la surface de la cellule également en interagissant avec son propre récepteur.

En conséquence, nous avons détecté de très faible quantité de CCL21 dans les surnageants de culture de NLC lors de l'analyse par *Luminex*.

En revanche, nous avons pu détecter différentes cytokines et chimiokines sécrétées par les NLC tel que CXCL13, CXCL12, CCL22 et CCL3.

De façon intéressante nous avons constaté aussi une forte sécrétion de CCL2 qui est connu comme facteur d'attraction des monocytes qui se différencient en NLC. Ce résultat corrobore une étude montrant le rôle crucial de ce dernier dans le recrutement de monocytes exprimant le CCR2 au niveau des ganglions de patient atteint de LLC (125). Cela suggère de cibler directement les NLC en bloquant leur recrutement via le CCR2 pour mieux traiter la LLC.

La majorité des TAM sont d'origine monocyttaire (134), avec un potentiel d'auto-renouvellement très faible (135), et leur recrutement dans les tissus tumoraux est assuré par un ensemble des cytokines et chimiokines principalement le CCL2 (136). Pour cette raison, le blocage du recrutement des macrophages a été longtemps investigué dans des modèles précliniques et dernièrement en évaluation clinique (137). Plusieurs nouvelles lignes d'anticorps anti-CCL2 sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques et les résultats ont montré une importante activité anti-tumorale chez les patients atteints de cancer avancés de la prostate (138).

Vu le succès du blocage de recrutement des monocytes dans les différents cancers, le blocage de recrutement des monocytes par un anti-CCL2 dans la LLC apparaît à première vue comme une cible idéale pour empêcher le nichage des NLC qui sont responsables de la rétention et le maintien en vie des cellules leucémiques dans les ganglions.

Vu le rôle critique des rôles des NLC dans la survie et la rétention des cellules leucémiques, plusieurs stratégies ont été développées afin de cibler les NLC.

Une stratégie vise particulièrement la différenciation des NLC. Le traitement par le lénalidomide, contribue à la différenciation des monocytes de LLC en M1 avec un rôle anti-tumoral plutôt qu'en NLC qui ont un phénotype M2 avec des fonctions pro-tumorales (139). Il sera intéressant de mieux décrire les facteurs impliqués dans la différenciation monocytes en NLC dans le but de diriger cette différenciation en faveur des macrophages M1 anti tumoraux

Une autre stratégie vise le récepteur CXCR4 qui se lie à la chimiokine CXCL12 qui est produite par les NLC et impliquée dans la migration et la survie des cellules leucémiques exprimant le CXCR4 (86). Deux antagonistes de CXCR4, l'AMD3100 et le T41, ont montré leurs effets dans la diminution de la migration des cellules leucémiques induite par CXCL12 (140). En inhibant la migration et les effets pro-survie de CXCL12, les antagonistes de CXCR4 permettent de combattre les effets pro-survie des NLC.

On peut noter qu'aujourd'hui aucune étude n'a ciblé directement les NLC car les mécanismes par lesquels elles favorisent la rétention et la survie des cellules leucémiques mettent en jeu des molécules aussi impliquées des mécanismes physiologiques, ce qui pourrait conduire à des déséquilibres physiologiques. Il est donc très important de mieux caractériser ces cellules afin de trouver un marqueur dont l'expression soit vraiment spécifique à cibler.

3. Expression de CCR7 par les lymphocytes B de LLC

Dans notre étude, nous avons pu observer que les cellules de LLC expriment de façon importante le récepteur CCR7 dans les ganglions tumoraux, ce qui corrobore les résultats des données de cytométrie de flux des cellules circulantes de LLC (50). La co-expression de CD20 et de CCR7 confirme que les cellules B tumorales expriment le CCR7. Au vue de la positivité « paradoxale » de CCR7 dans les centres germinatifs du ganglion inflammatoire (Figure 27), la spécificité de l'anticorps monoclonal utilisé a été vérifiée sur un bloc multitissulaire de tissus normaux non lymphoïdes. Nous avons détecté la positivité de certains types cellulaires comme les macrophages alvéolaires du poumon ou l'épithélium tubulaire du rein qui expriment le CCR7 (141), ce qui a confirmé la spécificité de nos marquages des cellules du centre germinatif (Figure 28).

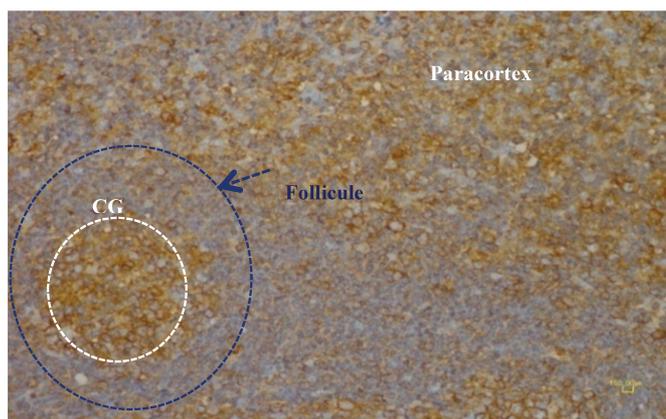


Figure 27 : Coupe de ganglion inflammatoire. Immunomarquage avec l'anti-CCR7 (X200)

Les résultats peuvent paraître paradoxaux car les lymphocytes B ne devraient pas exprimer le CCR7. Une hypothèse serait que l'expression de CCR7 dans les centres germinatifs réactionnels soit modulée par le BCR comme cela a été déjà décrit (142)

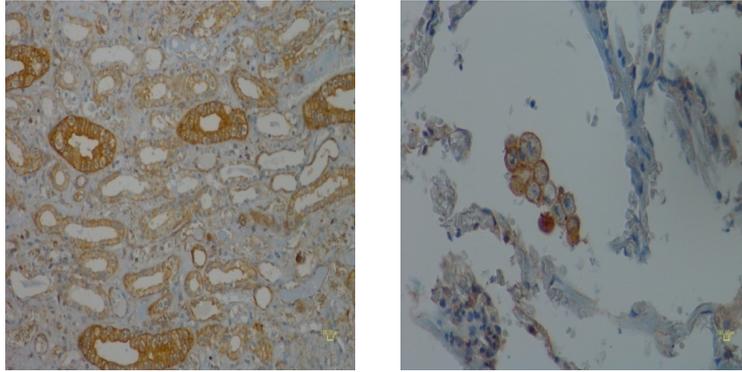


Figure 28 : Tissus non tumoraux marqués par l'anticorps anti-CCR7 (A) tubules rénaux, (B) Macrophages alvéolaires (X200).

Cette expression pourrait avoir une implication dans la rétention des cellules tumorales dans les tissus et en particulier dans le ganglion via l'interaction avec des cellules stromales produisant des chimiokines CCL21 ou CCL19, ligands de CCR7 (143). Le CCR7 est principalement impliqué dans la régulation de la migration des lymphocytes T et B dans les ganglions. Une étude a démontré le recrutement de cellules de mélanome métastatiques CCR7+ dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs exprimant le CCL21 (144). En effet nos échantillons de tumeurs montraient la prépondérance des cellules stromales CCL21 diffusément réparties dans le ganglion.

Un modèle parfait pour étudier le microenvironnement ganglionnaire est difficile à établir. Les études réalisées sur des lignées cellulaires ne sont pas totalement adaptées car ces dernières prolifèrent et donc ne miment pas les cellules leucémiques quiescentes. Nous avons ainsi choisi de travailler directement sur les cellules primaires issues de prélèvements sanguins de patients, bien que ces dernières présentent aussi comme désavantage majeur, la grande hétérogénéité individuelle.

Pour vérifier que l'expression de CCR7 est modulée par l'activation de BCR, un modèle fonctionnel de co-culture a été développé afin de mimer le microenvironnement ganglionnaire, en particulier les interactions entre les cellules leucémiques et les cellules du microenvironnement. Pour cela, nous avons établi un modèle de co-culture des lymphocytes tumoraux issus du sang périphérique et des cellules stromales isolées à partir de fragments ganglionnaires non tumoraux.

Les cellules stromales recueillies étaient positives pour l'alpha actine du muscle lisse et négatif pour les marqueurs des cellules folliculaires dendritiques (CD21, CD23 CXCL13), le marqueur des macrophages le CD68. L'expression forte de l'actine, plaide en faveur du type FRC de ces cellules mais il faudrait vérifier la présence d'autres marqueurs habituellement exprimés par ces cellules comme CD44, cadherin-11, CD140 α et CD140 β , VCAM pour confirmer la nature de ces cellules. Ce modèle reste néanmoins ce très artificiel et il ne peut pas reproduire complètement les complexes interactions cellulaires présentes dans un ganglion

Les résultats du marquage des lymphocytes en co-culture avec les cellules stromales montrent une augmentation de l'expression de CCR7 suite à la stimulation l'anti IgM. Des études montrent que l'activation du BCR favorise l'expression du CCR7 dans les lymphocytes normaux et dans des cas de LLC avec un statut non muté de l'IGHV (142).

Nous avons pu confirmer le rôle du microenvironnement dans le maintien des cellules leucémiques. Les cellules B en culture seules étaient caractérisées par un taux d'apoptose plus important que les cellules B en co-culture avec les cellules stromales (22% contre 11%).

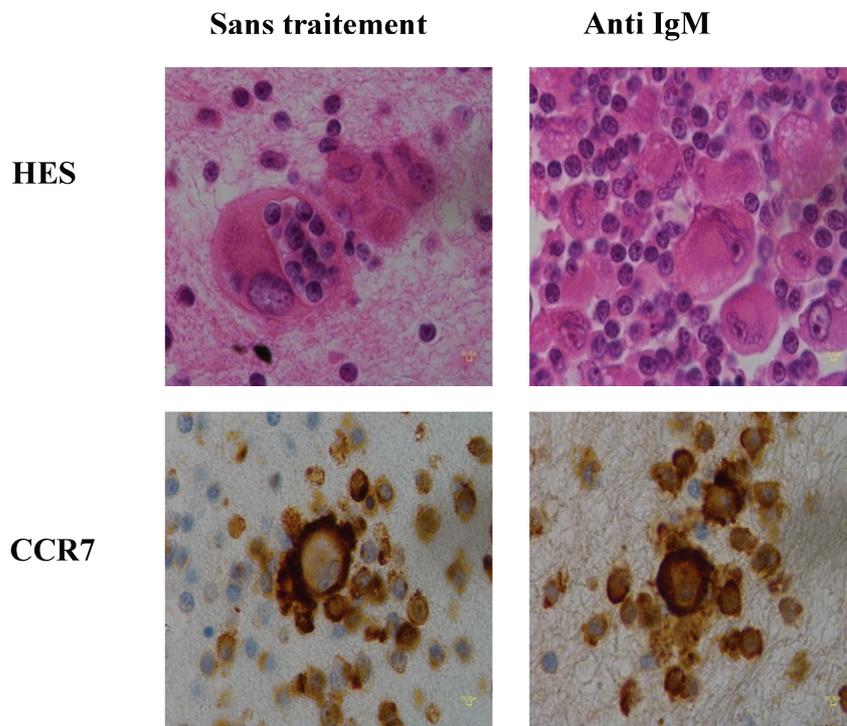


Figure 29 : Coloration HES et immunomarquages avec l'anti-CCR7 des cocultures des lymphocytes B avec les cellules stromales non traitées ou traitées avec anti IgM.

Le CCR7 exprimé par les cellules circulantes ainsi que les cellules des ganglions de patients atteints de LLC, pourrait avoir une implication dans l'entrée la rétention des cellules tumorales dans les tissus et en particulier dans le ganglion via l'interaction avec des NLC produisant CCL21 que nous avons décrit, et donc ce récepteur pourrait avoir un rôle crucial dans le développement des lymphadénopathies. D'autres études ont montré que le CCR7 est fortement exprimé chez les patients atteints de LLC (145).

Ces résultats suggèrent que le blocage des cellules leucémique par un anticorps anti-CCR7 pourrait être un traitement efficace et prometteur pour le traitement de la LLC. Une étude préclinique a évalué l'efficacité *in vitro* de l'anticorps anti-CCR7, et montre une élimination efficace des cellules de la LLC tout en épargnant des sous-ensembles de cellules T chez ces patients (145).

Nous pouvons imaginer un modèle d'étude *ex vivo* plus adapté qui implique une culture en trois dimensions, contenant les cellules leucémiques issues du sang périphérique, et les cellules du microenvironnement ganglionnaire obtenues à partir des biopsies ganglionnaires tumorales qui sont très rarement prélevées dans la LLC.

En conclusion, notre étude a mis la lumière sur la désorganisation de l'architecture des ganglions lymphatiques induite par l'infiltration diffuse des lymphocytes B leucémiques. Dans ce contexte, nous avons montré pour la première fois que les cellules CD68⁺ produisent la chimiokine CCL21, ce qui suggère qu'elles pourraient être une source complémentaire de cette chimiokine normalement sécrétée par les FRC. Le CCL21 sécrété par ces cellules pourrait jouer un rôle important dans l'attraction et la rétention des cellules B de LLC exprimant le récepteur CCR7, favorisant ainsi leur survie, leur prolifération au niveau de leur niche tumorale le ganglion lymphatique. Au vu de rôle joué par les cellules CD68⁺ elles constituent donc une cible thérapeutique de choix afin de développer de nouveaux traitements dans cette pathologie.

Références bibliographiques

1. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Bird of a Different Feather. *JCO*. 1 janv 1999;17(1):399-399.
2. Deglesne P-A, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival Response to B-Cell Receptor Ligation Is Restricted to Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Irrespective of Zap70 Expression. *Cancer Res*. 15 juill 2006;66(14):7158-66.
3. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 5 juin 2011;475(7354):101-5.
4. Buggins AGS, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res*. juill 2010;34(7):837-42.
5. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS*. 27 sept 2005;102(39):13944-9.
6. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 22 mars 2008;371(9617):1017-29.
7. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 1 nov 2008;112(9):3807-17.
8. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schröder M, Schlegelberger B, Fischer K, et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *PNAS*. 15 oct 1996;93(21):11837-41.
9. Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *International Journal of Cancer*. 1996;69(2):114-9.
10. Lin K, Rockcliffe N, Johnson GG, Sherrington PD, Pettitt AR. Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene*. 10 avr 2008;27(17):2445-55.
11. Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. mai 1994;24(5):445-51.
12. Sellmann L, de Beer D, Bartels M, Opalka B, Nüchel H, Dührsen U, et al. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Hematol*. 1 janv 2011;93(1):74-82.
13. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. oct 1994;8(10):1640-5.

14. Pers JO, Berthou C, Porakishvili N, Burdjanadze M, Le Calvez G, Abgrall JF, et al. CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. janv 2002;16(1):44-52.
15. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*. 15 mai 2008;111(10):5101-8.
16. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. sept 2007;20(3):367-84.
17. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. août 1975;46(2):219-34.
18. Leblond veronique. La leucemie lymphoïde chronique et la maladie de Waldenström. John Libbey Eurotext; 2009. (Hématologie-collection FMC).
19. Willard-Mack CL. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):409-24.
20. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*. 19 févr 1998;391(6669):799-803.
21. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*. 12 nov 2010;143(4):592-605.
22. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. janv 2008;8(1):22-33.
23. Anderson AO, Shaw S. T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. *Semin Immunol*. août 1993;5(4):271-82.
24. Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*. déc 2006;25(6):989-1001.
25. Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, Proudfoot AE, Shaw S. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J Exp Med*. 20 nov 2000;192(10):1425-40.
26. Farr AG, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, Aruffo A. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med*. 1 nov 1992;176(5):1477-82.
27. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 nov 2000;97(23):12694-9.

28. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 janv 1998;95(1):258-63.
29. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol*. sept 2009;9(9):618-29.
30. Ushiki T, Ohtani O, Abe K. Scanning electron microscopic studies of reticular framework in the rat mesenteric lymph node. *Anat Rec*. janv 1995;241(1):113-22.
31. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. *The Journal of Experimental Medicine*. 2 juill 2001;194(1):45.
32. Girard J-P, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. nov 2012;12(11):762-73.
33. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. nov 2003;3(11):867-78.
34. Gonzalez SF, Degn SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:215-33.
35. Nakano H, Mori S, Yonekawa H, Nariuchi H, Matsuzawa A, Kakiuchi T. A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood*. 15 avr 1998;91(8):2886-95.
36. Denton AE, Linterman MA. Stromal networking: cellular connections in the germinal centre. *Curr Opin Immunol*. avr 2017;45:103-11.
37. Davids MS, Deng J, Wiestner A, Lannutti BJ, Wang L, Wu CJ, et al. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 25 oct 2012;120(17):3501-9.
38. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 13 janv 2011;117(2):563-74.
39. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. janv 1996;92(1):97-103.
40. Sivina M, Hartmann E, Vasyutina E, Boucas JM, Breuer A, Keating MJ, et al. Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. août 2012;26(8):1812-20.
41. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. févr 2014;24:71-81.
42. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. sept 1999;106(4):995-1004.

43. MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJS, Barnett GA, Pringle JH, et al. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene*. 3 oct 2002;21(44):6809-18.
44. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rai KJ, Gilling-Cutucache CE, Nordgren TM, Moragues M, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease. *Mol Med*. 15 juill 2014;20:290-301.
45. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. mars 2016;1863(3):401-13.
46. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. févr 2001;2(2):123-8.
47. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 1 mai 2006;107(9):3584-92.
48. Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 nov 2007;110(9):3316-25.
49. Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Förster R, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*. 7 mars 2002;416(6876):94-9.
50. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 15 avr 2002;99(8):2977-84.
51. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res*. 1 mai 2009;69(9):4001-9.
52. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 mai 2002;99(10):6955-60.
53. Gorgun G, Ramsay AG, Holderried TAW, Zahrieh D, Le Dieu R, Liu F, et al. E(mu)-TCL1 mice represent a model for immunotherapeutic reversal of chronic lymphocytic leukemia-induced T-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 avr 2009;106(15):6250-5.
54. Phillips JA, Mehta K, Fernandez C, Raveché ES. The NZB mouse as a model for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 15 janv 1992;52(2):437-43.
55. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin Y-C, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. 15 juin 2007;109(12):5079-86.

56. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 nov 2002;99(24):15524-9.
57. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 19 janv 2010;17(1):28-40.
58. Wen X, Zhang D, Kikuchi Y, Jiang Y, Nakamura K, Xiu Y, et al. Transgene-mediated hyper-expression of IL-5 inhibits autoimmune disease but increases the risk of B cell chronic lymphocytic leukemia in a model of murine lupus. *Eur J Immunol*. oct 2004;34(10):2740-9.
59. Zapata JM, Krajewska M, Morse HC, Choi Y, Reed JC. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 nov 2004;101(47):16600-5.
60. Zhang W, Kater AP, Widhopf GF, Chuang H-Y, Enzler T, James DF, et al. B-cell activating factor and v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) influence progression of chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2 nov 2010;107(44):18956-60.
61. Bertilaccio MTS, Scielzo C, Simonetti G, Ponzoni M, Apollonio B, Fazi C, et al. A novel Rag2^{-/-}-gammac^{-/-}-xenograft model of human CLL. *Blood*. 25 févr 2010;115(8):1605-9.
62. Dürig J, Ebeling P, Grabellus F, Sorg UR, Möllmann M, Schütt P, et al. A novel nonobese diabetic/severe combined immunodeficient xenograft model for chronic lymphocytic leukemia reflects important clinical characteristics of the disease. *Cancer Res*. 15 sept 2007;67(18):8653-61.
63. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. déc 2005;5(12):953-64.
64. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. nov 2002;23(11):549-55.
65. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. mars 2012;122(3):787-95.
66. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. 13 août 2014;6(3):1670-90.
67. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol*. mars 2011;12(3):231-8.
68. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. déc 2004;25(12):677-86.

69. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* oct 2010;11(10):889-96.
70. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer.* 15 mai 2008;122(10):2286-93.
71. Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihaneck M, Tseng J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 1 nov 1998;161(9):5027-38.
72. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* nov 2009;86(5):1065-73.
73. Alahari SV, Dong S, Alahari SK. Are Macrophages in Tumors Good Targets for Novel Therapeutic Approaches? *Mol Cells.* 28 févr 2015;38(2):95-104.
74. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2 avr 2010;141(1):39-51.
75. Dalton HJ, Armaiz-Pena GN, Gonzalez-Villasana V, Lopez-Berestein G, Bar-Eli M, Sood AK. Monocyte subpopulations in angiogenesis. *Cancer Res.* 1 mars 2014;74(5):1287-93.
76. Colditz IG, Schneider MA, Pruenster M, Rot A. Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. *Thromb Haemost.* mai 2007;97(5):688-93.
77. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Strom SR, Burdick MD, et al. Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. *Cancer Immunol Immunother.* mai 2000;49(2):63-70.
78. Qian B-Z, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 8 juin 2011;475(7355):222-5.
79. Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, et al. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest.* mai 1995;95(5):2391-6.
80. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, et al. The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia.* nov 2009;11(11):1235-42.
81. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, et al. Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol.* 1 avr 2000;164(7):3862-9.
82. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood.* 15 oct 2004;104(8):2224-34.

83. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 19 mars 2001;193(6):727-40.
84. Eiró N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, Junquera S, Lamelas ML, del Casar JM, et al. Impact of CD68/(CD3+CD20) Ratio at the Invasive Front of Primary Tumors on Distant Metastasis Development in Breast Cancer. *PLoS One* [Internet]. 26 déc 2012 [cité 4 mars 2019];7(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530508/>
85. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*. 16 déc 2011;9:216.
86. 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*. 15 oct 2000;96(8):2655-63.
87. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol*. août 2013;13(4):595-601.
88. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*. 15 juill 2010;70(14):5728-39.
89. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, et al. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol*. oct 2003;163(4):1233-43.
90. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. mars 2008;13(3):206-20.
91. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. sept 2005;8(3):211-26.
92. Mazziere R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 12 avr 2011;19(4):512-26.
93. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. avr 2009;9(4):239-52.
94. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):285-93.
95. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. juin 2012;18(6):883-91.

96. Gil-Bernabé AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, et al. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood*. 29 mars 2012;119(13):3164-75.
97. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 1 mars 2006;107(5):2112-22.
98. Ojalvo LS, King W, Cox D, Pollard JW. High-Density Gene Expression Analysis of Tumor-Associated Macrophages from Mouse Mammary Tumors. *Am J Pathol*. mars 2009;174(3):1048-64.
99. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol*. 2013;4:190.
100. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol*. avr 2015;36(4):229-39.
101. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 17 juill 2014;41(1):49-61.
102. Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma*. déc 2004;45(12):2365-72.
103. Ysebaert L, Fournié J-J. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. juill 2011;52(7):1404-6.
104. Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, et al. Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica*. juin 2014;99(6):1078-87.
105. Filip AA, Ciseł B, Koczkodaj D, Wąsik-Szczepanek E, Piersiak T, Dmoszyńska A. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis*. avr 2013;50(4):263-70.
106. Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willis AC, et al. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol*. sept 1993;23(9):2320-5.
107. Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van den Berg TK, Fluitsma DM, Dijkstra CD, et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol*. nov 1999;66(5):858-66.
108. Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis*. mars 2007;191(1):48-53.
109. Wagener FADTG, Volk H-D, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*. sept 2003;55(3):551-71.

110. Schaer DJ, Boretti FS, Hongegger A, Poehler D, Linnscheid P, Staeger H, et al. Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics*. mars 2001;53(2):170-7.
111. Zwadlo G, Voegeli R, Schulze Osthoff K, Sorg C. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol*. 1987;55(6):295-304.
112. Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, et al. Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1 févr 2013;19(3):731-42.
113. MATSUSHITA N, KASHIWAGI M, WAIT R, NAGAYOSHI R, NAKAMURA M, MATSUDA T, et al. Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin Exp Immunol*. oct 2002;130(1):156-61.
114. Baeten D, Møller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum*. mai 2004;50(5):1611-23.
115. Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*. 22 janv 2009;113(4):887-92.
116. Boissard F, Laurent C, Ramsay AG, Quillet-Mary A, Fournié J-J, Poupot M, et al. Nurse-like cells impact on disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. janv 2016;6(1):e381.
117. Salmi S, Siiskonen H, Sironen R, Tyynelä-Korhonen K, Hirschovits-Gerz B, Valkonen M, et al. The number and localization of CD68+ and CD163+ macrophages in different stages of cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 5 nov 2018;
118. Shiraishi D, Fujiwara Y, Horlad H, Saito Y, Iriki T, Tsuboki J, et al. CD163 Is Required for Protumoral Activation of Macrophages in Human and Murine Sarcoma. *Cancer Res*. 15 juin 2018;78(12):3255-66.
119. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, 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*. 1 août 2005;106(3):1012-20.
120. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:231-64.
121. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 20 juill 2000;406(6793):309-14.
122. 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*. 1 déc 1999;94(11):3658-67.

123. Borge M, Remes Lenicov F, Nannini PR, de los Ríos Alicandú MM, Podaza E, Ceballos A, et al. The expression of sphingosine-1 phosphate receptor-1 in chronic lymphocytic leukemia cells is impaired by tumor microenvironmental signals and enhanced by piceatannol and R406. *J Immunol*. 15 sept 2014;193(6):3165–74.
124. Audrito V, Serra S, Brusa D, Mazzola F, Arruga F, Vaisitti T, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 janv 2015;125(1):111–23.
125. van Attekum MHA, van Bruggen JAC, Slinger E, Lebre MC, Reinen E, Kersting S, et al. CD40 signaling instructs chronic lymphocytic leukemia cells to attract monocytes via the CCR2 axis. *Haematologica*. 2017;102(12):2069–76.
126. Bhattacharya N, Diener S, Idler IS, Barth TF, Rauen J, Habermann A, et al. Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14⁺ cells from peripheral blood. *Leukemia*. avr 2011;25(4):722–6.
127. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertoncelli L, Martinelli S, Guarnotta C, et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*. juill 2013;98(7):1115–23.
128. Panse J, Friedrichs K, Marx A, Hildebrandt Y, Luetkens T, Bartels K, et al. Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br J Cancer*. 16 sept 2008;99(6):930–8.
129. Burger JA, Montserrat E. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood*. 28 févr 2013;121(9):1501–9.
130. Heinig K, Gätjen M, Grau M, Stache V, Anagnostopoulos I, Gerlach K, et al. Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov*. déc 2014;4(12):1448–65.
131. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol*. sept 2009;9(9):618–29.
132. Nederby L, Roug AS, Knudsen SS, Skovbo A, Kjeldsen E, Moller HJ, et al. Soluble CD163 as a prognostic biomarker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(11):3219–21.
133. Hirose J, Kawashima H, Swope Willis M, Springer TA, Hasegawa H, Yoshie O, et al. Chondroitin sulfate B exerts its inhibitory effect on secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) by binding to the C-terminus of SLC. *Biochim Biophys Acta*. 3 juill 2002;1571(3):219–24.
134. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. juill 1992;13(7):265–70.
135. Bottazzi B, Erba E, Nobili N, Fazioli F, Rambaldi A, Mantovani A. A paracrine circuit in the regulation of the proliferation of macrophages infiltrating murine sarcomas. *The Journal of Immunology*. 15 mars 1990;144(6):2409–12.

136. Weitzenfeld P, Ben-Baruch A. The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer. *Cancer Lett.* 28 sept 2014;352(1):36-53.
137. Tymoszuk P, Evens H, Marzola V, Wachowicz K, Wasmer M-H, Datta S, et al. In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *Eur J Immunol.* août 2014;44(8):2247-62.
138. Pienta KJ, Machiels J-P, Schrijvers D, Alekseev B, Shkolnik M, Crabb SJ, et al. Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs.* juin 2013;31(3):760-8.
139. Ramsay AG, Gribben JG. Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug. *Haematologica.* sept 2009;94(9):1198-202.
140. 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.* 1 sept 2005;106(5):1824-30.
141. Fleming MD, Pinkus JL, Fournier MV, Alexander SW, Tam C, Loda M, et al. Coincident expression of the chemokine receptors CCR6 and CCR7 by pathologic Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 1 avr 2003;101(7):2473-5.
142. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood.* 20 oct 2011;118(16):4401-10.
143. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1 oct 1999;99(1):23-33.
144. Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DSB. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 1 avr 2004;10(7):2351-8.
145. Cuesta-Mateos C, Loscertales J, Kreutzman A, Colom-Fernández B, Portero-Sáinz I, Pérez-Villar JJ, et al. Preclinical activity of anti-CCR7 immunotherapy in patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* juin 2015;64(6):665-76.