



HAL
open science

Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Vincent Biajoux

► **To cite this version:**

Vincent Biajoux. Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT: 2013PA114825 . tel-01740411v1

HAL Id: tel-01740411

<https://theses.hal.science/tel-01740411v1>

Submitted on 22 Mar 2018 (v1), last revised 19 Jul 2018 (v2)

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE :

IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2009 - 2013

SÉRIE DOCTORAT N° 1245

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 30/09/2013

par

Vincent BIAJOUX

Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement
et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Directeur de thèse :

Dr. Karl BALABANIAN

CR1 INSERM (INSERM U996, Univ. Paris-Sud)

Composition du jury :

Président du jury :

Pr. Pierre GALANAUD

PU-PH (Hôp. A.Béclère - Univ. Paris XI)

Rapporteurs :

Pr. Bruno CANQUE

PE (Inst. Univ. d'Hématologie - Univ. Paris VII)

Pr. Olivier HERMINE

PU-PH (Hôp. Necker - Univ. Paris V)

Examineurs :

Dr. William ROSTENE

DRCE (Inst. de la Vision - Univ. Paris VI)

Dr. Christophe COMBADIÈRE

DR2 (Hôp. la Pitié-Salpêtrière - Univ. Paris VI)

Dr. Fawzia LOUACHE

DR2 (INSERM U1009 - Univ. Paris XI)

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

***Impact d'un gain de fonction de Cxcr4
sur le développement et la
compartimentalisation périphérique
des lymphocytes***

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Remerciements

A M. le Dr Karl Balabanian, pour m'avoir permis d'effectuer ce doctorat et supporté, tant matériellement que moralement, quatre années durant.

A M. le Pr. Pierre Galanaud, pour avoir eu la bienveillance d'accepter de juger pour la seconde fois la qualité de mon travail.

A M. le Pr. Bruno Canque et M. le Pr. Olivier Hermine pour avoir accepté de rapporter ce travail.

A M. le Dr. Wiliam Rostène, M. le Dr. Christophe Combadière et Mme. le Dr. Fawzia Louache pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

A M. le Dr. Thierry Walzer pour son dynamisme, sa convivialité et les collaborations entreprises durant mon doctorat.

A M. le Dr. Nicolas Fazilleau pour sa moustache et le travail collaboratif sur l'immunité humorale.

A M. Alexandre Bignon pour son support durant quatre ans.

A Mme. Laurence Bouchet-Delbos pour m'avoir appris et laborieusement poussé à utiliser mes capacités expérimentales à l'excellence.

A M. le Dr. Patrice Hemon pour sa passion du système lymphoïde périphérique.

Aux collaborateurs nationaux, pour leur savoir-faire et leur enthousiasme : Mme. le Dr. Katia Mayol, Mme. Emilie Debien et M. le Dr. Antoine Sacquin.

Aux membres de l'équipe de recherche n°IV de l'unité de recherche INSERM UMR_S996 pour l'animation du bureau et de la salle d'expérimentation : M. le Pr. Ali Dalloul, Mme. Christelle Freitas et Mme. Françoise Gaudin.

Aux membres de l'unité de recherche INSERM UMR_S996 pour leur patience et méticulosité : Mme. Odile Boulin, M. Bruno Choisi, M. Didier Robrieux et Mme Marie-Laure Aknin.

Au regretté M. le Pr. Dominique Emilie.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AID : *Activation-induced deaminase*

AIRE : *Auto-immune regulator element*

Arg : Arginine

ARN : Acide ribonucléique

β -Arr : β -Arrestine

BBXB : Basique-Basique-X-Basique

BCR : *B-cell receptor*

BEC : Boucle extracellulaire

BIC : Boucle intracellulaire

BLC : *B-lymphocyte chemoattractant*

BRET : *Bioluminescence resonance energy transfer*

CD : *Cluster of differentiation*

CDe : Cellule dendritique

CEO : Cancer épithélial de l'ovaire

CG : Centre germinatif

CK : Chimiokine

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPAc : Cellule productrice d'anticorps

CPAg : Cellule présentatrice d'antigène

CSH : Cellule souche hématopoïétique

Cys : Cystéine

DAMP : *Damage-associated molecular pattern*

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

DN : Double-négatif

DP : Double-positif

DRYLAIV : Asp/Arg/Tyr/Leu/Ala/Ile/Val

DRYLSIT : Asp/Arg/Tyr/Leu/Ser/Ile/Thr

ELR : Glu/Leu/Arg

ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

ETP : *Early thymic progenitor*

FT : Facteur de transcription

G-CSF : *Granulocyte colony-stimulating factor*

GAG : Glycosaminoglycane

GL : Ganglion lymphatique

GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GRK : *G-protein-coupled receptor kinase*

HEV : *High endothelial venule*

HIF : *Hypoxia inducible factor*

His : Histidine

HMGB1 : *High mobility group box-1*

HS : Héparane sulfate

ICOS : *Inductible costimulator*

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ITAM : *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM : *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*

KAR : *Killer activating receptor*

kDa : kiloDalton

KIR : *Killer inhibitory receptor*

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

LTi : *Lymphoid tissue inducer*

LED : Lupus érythémateux disséminé

Lys : Lysine

LYVE : *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MEC : Matrice extracellulaire

MIF : *Macrophage migration inhibitory factor*

MO : Moelle osseuse

NET : *Neutrophil extracellular trap*

NK : *Natural killer*

NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domain*

OLP : Organes lymphoïdes primaires

OLS : Organes lymphoïdes secondaires

PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*

PB-CKR : *Pre-B-cell-derived chemokine receptor*

PBSF : *Pre-B-cell growth-stimulating factor*

PC : Plasmocyte

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PLC : Progéniteurs lymphoïdes communs

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PP : Plaque de Peyer

PreB : Précurseur lymphoïde B

ProB : Progéniteur lymphoïde B

RCK : Récepteur de chimiokine

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

RFFESH : Arg/Phe/Phe/Glu/Ser/His

S1P : *Sphingosine-1-phosphate*

S1PR : *Sphingosine-1-phosphate receptor*

SCF : *Stem cell factor*

SDF-1 : *Stromal cell derived factor-1*

Ser : Sérine

SHSK : Ser/His/Ser/Lys

SI : Système immunitaire

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SLC : *Secondary lymphoid-tissue chemokine*

SNC : Système nerveux central

SP : Simple-positif

SW : Syndrome WHIM

TCR : *T-cell receptor*

TdT : *Terminal deoxyribonucleotidyl transferase*

TGF- β : *Transforming growth factor β*

Th : *T helper cell*

Thr : Thréonine

TLR : *Toll-like receptor*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIP : *Vasoactive intestinal peptide*

VPH : Virus du papillome humain

WHIM : *Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis*

WNV : *West Nile virus*

ZC : Zone claire

ZM : Zone marginale

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

ZS : Zone sombre

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I- Système immunitaire et lignage lymphoïde.....	1
1- Fonction générale	1
A- Immunité innée.....	1
B- Immunité adaptative.....	3
2- Hématopoïèse	7
A- Cellules souches et niches hématopoïétiques.....	7
B- Ontogénie lymphoïde	10
a- Lymphocytes B.....	10
b- Lymphocytes T.....	12
c- Natural Killer.....	15
3- Différenciation périphérique	16
A- Sortie des organes lymphoïdes primaires.....	16
B- Recrutement dans les organes lymphoïdes secondaires.....	17
C- Positionnement dans les organes lymphoïdes secondaires.....	18
D- Activation.....	19
E- Recrutement dans les sites inflammatoires.....	21
4- Mémoire immunitaire	22
A- Domiciliation médullaire	22
B- Survie et maintien.....	23
II- Chimiokines et leurs récepteurs.....	23
1- Origine et rôle	23
2- Chimiokines	27
A- Classification structurale	27
B- Classification fonctionnelle.....	28
3- Récepteurs de chimiokines.....	28
A- Classification structurale	28
B- Classification fonctionnelle.....	30
4- Signalisation et effets biologiques	31
A- Modèle de signalisation	31
B- Eventail des réponses cellulaires.....	33
III- Le trio CXCR4, CXCR7 et CXCL12.....	33
1- CXCL12.....	33
A- Découverte	33

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

B- Expression tissulaire.....	34
a- Constitutive.....	34
b- Inductible	35
C- Régulation de l'expression et de la disponibilité	35
a- Transcription	35
b- Interaction avec les GAGs.....	36
c- Clivage protéolytique.....	36
d- Régulation par les récepteurs atypiques	37
2- CXCR4	37
A- Historique	37
B- Expression ubiquitaire.....	39
C- Régulation de l'expression et de l'activité	40
a- Transcription et expression protéique.....	40
b- Découplage expression/fonction	41
c- Désensibilisation	41
d- Internalisation, dégradation et recyclage.....	42
e- Modifications post-traductionnelles	42
D- Deux modèles de signalisation	43
a- Séquentiel.....	43
b- Simultané.....	44
E- Fonctions principales intégrées par CXCR4.....	45
a- Migration cellulaire	45
b- Migration trans-endothéliale.....	46
c- Quiescence des cellules souches.....	47
d- Prolifération.....	48
e- Survie.....	49
f- Transcytose de Cxcl12	49
3- CXCR7	49
A- Historique	49
B- Expression tissulaire.....	50
C- Régulation de l'expression et de l'activité	50
a- Transcription	50
b- Découplage expression/fonction	50
c- Internalisation et recyclage	51
D- Modèles de signalisation.....	51
E- Fonctions cellulaires de CXCR7	52

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

a- Récepteur « leurre » de CXCL12	52
b- Partenaire de CXCR4	52
c- Prolifération et survie	53
d- Migration cellulaire.....	53
IV- L'axe de signalisation CXCL12-CXCR4 en physiologie	53
1- Hématopoïèse	53
A- Cellules souches hématopoïétiques	53
B- Lignage B.....	54
C- Lignage T	54
D- Lignage NK.....	54
2- Différenciation périphérique des lymphocytes	55
A- Compartimentalisation lymphoïde.....	55
B- Réponse immunitaire à médiation humorale	55
C- Maintien de la mémoire immunitaire spécifique.....	56
V- L'axe de signalisation CXCR4-CXCL12 en pathologie	56
1- Infection par le virus de l'immunodéficience humaine	56
2- Développement du Lupus Erythémateux Disséminé	57
3- Implication dans le cancer épithélial de l'ovaire	58
VI- Rôle étiologique de CXCR4 dans le Syndrome WHIM	60
1- Physiopathologie	60
2- Altération lymphoïde	60
3- Hétérogénéité des patients	61
4- Impasse thérapeutique.....	64
OBJECTIFS DES TRAVAUX	66
RESULTATS	69
I- Les souris <i>Cxcr4</i>^{+/1013}, un modèle leucopénique du Syndrome WHIM	69
1- Rationnel.....	69
2- Exposé des travaux.....	70
Article n°1 : « Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice » (Blood, 2012)	70
3- Conclusion et perspectives	95
II- Rôles de <i>Cxcr4</i> et <i>S1P5</i> dans l'homéostasie des lymphocytes NK chez la souris. 98	98
1- Rationnel.....	98
2- Exposé des travaux.....	99

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Article n°2 : « Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking » (Blood, 2011).....	99
3- Conclusion et perspectives	114
III- La désensibilisation de Cxcr4 régule de façon intrinsèque aux cellules l'homéostasie lymphocytaire et l'immunité humorale	115
1- Rationnel.....	115
2- Exposé des travaux.....	117
Article n°3 : « Fine-tuning CXCR4 desensitization in lymphopoiesis intrinsically regulates lymphocyte homeostasis and humoral immunity » (Soumis à J Exp Med).....	117
3- Conclusion et perspectives	172
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	178
1- Une empreinte de récepteurs identique	178
2- La trans-dominance, une prise d'otage membranaire ?	179
3- Les altérations de la lymphopoïèse B, un problème de niche ?	180
4- Hyperactivité de Cxcr4 et prise de greffe	181
5- La transcytose dans le recrutement médullaire	183
6- A propos du thymus.....	184
7- Cxcr4, Interleukine 7 et ganglions lymphatiques.....	185
8- Cxcr4 ¹⁰¹³ , une piste pour l'autoimmunité ?.....	186
9- S1P/S1PRs et Cxcl12/Cxcr4, quel axe de signalisation pour le traitement du Syndrome WHIM ?	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	190
ANNEXES	206
I- Autres publications.....	206
II- Curriculum Vitae	255

Introduction

« If you don't know where you are going, any road will get you there. »

Charles Lutwidge Dodgson, dit Lewis Carroll

(Alice's Adventures in Wonderland & Through the Looking Glass, 1871)

INTRODUCTION

I- Système immunitaire et lignage lymphoïde

1- Fonction générale

Le système immunitaire (SI) est un ensemble de processus cellulaires complexes dont le rôle principal est d'assurer l'intégrité de l'organisme. Lorsque celui-ci identifie une agression, qu'elle soit de nature xénobiotique ou tumorale, il met en place séquentiellement une cascade d'évènements dans le but de supprimer cette agression, notamment par la destruction du pathogène ou de la cellule identifiée comme dangereuse.

Dans la majorité des cas, le déclenchement de la réponse immunitaire a lieu lorsqu'un élément identifié comme pathogène est retrouvé dans l'organisme. Le passage des barrières épithéliales (notamment cutanées) ou des muqueuses par un élément pathogène, ou encore la transformation d'une cellule de l'organisme génère un signal de danger.

Lors de l'identification de ce signal de danger, le SI met en place séquentiellement deux types de réponses pour limiter l'expansion ou éliminer l'élément identifié comme potentiellement dangereux.

A- Immunité innée

Une réponse immunitaire non spécifique, dite « innée » ou « naturelle » existe avant l'apparition du signal de danger : elle est constituée des barrières physiologiques (pH environnant, sécrétion de RNase et/ou de protéases, barrière physique des épithéliums) et de la présence de cellules effectrices non spécifiques telles que les monocytes/macrophages, les cellules *natural killer* (NK) et les granulocytes. Le but de cette réponse est principalement de limiter l'expansion des cellules ou des tissus considérés comme dangereux et de les détruire de façon non spécifique.

La reconnaissance du signal de danger se fait par des immunorécepteurs spécifiques pour des motifs moléculaires associés au danger (*damage associated molecular pattern* (DAMP)) ou aux pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern* (PAMP)). Parmi

ceux-ci, les *toll-like receptors* (TLR) vont reconnaître les lipides, acides nucléiques ou des protéines nucléaires (telles que la protéine *high mobility group box-1* (HMGB1) ; les lectines de type C, qui reconnaissent les carbohydrates ; et les récepteurs de type *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) qui reconnaissent des peptides cytoplasmiques bactériens.

En réponse à l'activation de ces récepteurs, ces cellules vont être capables de libérer des molécules lytiques (granulocytes, NKs) qui vont perforer les cellules environnantes sans distinction. Elles limitent la dissémination des pathogènes *via* leur fixation par les *neutrophil extracellular trap* (NET) et *via* la phagocytose (macrophages, polynucléaires neutrophiles (PNN)). Enfin, elles assurent le lien avec une seconde réponse immunitaire par la production de cytokines qui vont activer les cellules présentatrices d'antigènes (Ag) (CPAg). (Kolaczowska & Kubes, 2013; Lanier, 2008) (**Figures 1 et 2**).

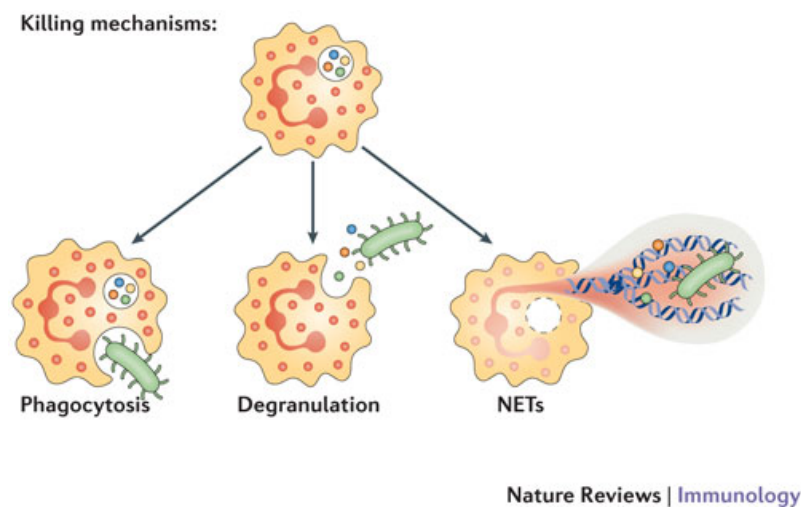


Figure 1: Mécanismes de défense et de limitation de l'infection par une cellule caractéristique de l'immunité innée : les polynucléaires neutrophiles (Kolaczowska & Kubes, 2013).

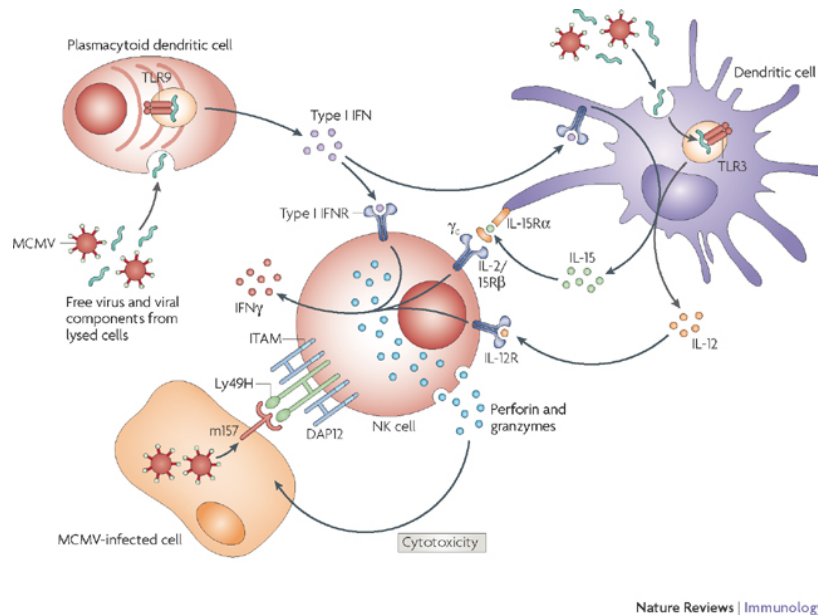


Figure 2 : Réponse à l'identification par les lymphocytes NK lors de l'identification d'une cellule pathogène. Les NK agissent par cytotoxicité et par la production de cytokines pour activer les cellules dendritiques (Lanier, 2008).

B- Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative, ou spécifique, est mise en place contre un Ag lors de la persistance du signal de danger afin de lutter plus efficacement contre celui-ci et d'assurer une mémoire immunitaire. Ce processus a pour but de prévenir une atteinte ultérieure et/ou d'y répondre plus efficacement. Contrairement à la réponse immunitaire innée, qui est indépendante de l'Ag, la réponse immunitaire adaptative est dirigée de façon très spécifique contre une séquence antigénique (ou épitope). La médiation de cette seconde réponse se fait principalement par les cellules dendritiques (CDe), les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT).

Les CDe sont des cellules présentes dans les tissus, spécialisées dans la capture, la dégradation, l'apprêtement et la présentation de peptides issus de la ou les cellule(s) identifiée(s) comme dangereuse(s). Les CDe sont des CPAg professionnelles qui initient la réponse immunitaire adaptative. La fonction des CDe étant dédiée à ce rôle, les CDe sont capables de mettre en place plus efficacement la réponse immunitaire adaptative ; on parle alors de cellules professionnelles de la présentation antigénique. Le processus de

capture et d'apprêtement se fait sous l'influence des différents signaux de danger et des cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité innée. Sous cet effet, les cytokines vont initier le processus de phagocytose (monocyte), de pinocytose (CDe) ; elles vont favoriser l'apprêtement antigénique et modifier le profil phénotypique de la CPAg pour lui permettre de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (OLS).

Dans ces sites, une faible proportion de LT naïfs sera capable de reconnaître spécifiquement un peptide apprêté et présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) d'une CPAg, qui donnera lieu à son activation si le second signal fourni est suffisant. Par exemple, le second signal peut être fourni par la fixation de CD28 (du LT) à la protéine B7 (de la CPAg) dont l'expression est induite par les signaux de danger ou *Inductible Costimulator* (ICOS) *via* ICOS-ligand.

Il existe deux types de voie de présentation de peptides aux LT. Les peptides de nature exogène sont présentés *via* le CMH de type II aux LT CD4⁺. Ils seront classiquement d'origine extracellulaire et résultera du processus de phagocytose. Les peptides de nature endogène (notamment viraux) sont présentés par un CMH de type I aux LT CD8⁺. Suivant le type de pathogène et la reconnaissance du signal de danger, les CDe vont produire des cytokines qui vont alors polariser la réponse immunitaire adaptative pour détruire le pathogène. Parmi ces réponses immunitaires adaptatives, le profil phénotypique des LT CD4⁺ va déterminer le mode d'action des cellules effectrices :

- Les LT CD4⁺ de type I (*T helper cell*, Th1) vont activer les LT CD8⁺ pour détruire les cellules infectées
- Les LT CD4⁺ de type II (Th2) vont permettre la mise en place du centre germinatif (CG) pour produire des LB et plasmocytes (PC) spécifiques de l'Ag.
- Les LT CD4⁺ producteurs d'interleukine (IL) 17 (Th17) ont un mode d'action peu connu, mais semblent recruter les PNN, activer les LT CD8⁺, macrophages, cellules épithéliales et endothéliales pour maintenir une inflammation.

Les LT CD8⁺ vont reconnaître un peptide chargé et présenté par un CMH de type I sur la CPAg. Cette fixation servira de signal d'activation au LT CD8⁺ qui, s'il est soumis à la costimulation des LT CD4⁺ environnants (qu'ils soient ou non sur la même CPAg)

entrera dans une phase de prolifération et de changements phénotypiques pour quitter l'OLS et rejoindre le site d'inflammation. Le LT CD8⁺ sera alors capable de reconnaître le CMH de type I chargé avec un peptide spécifique sur une cellule et la détruira, soit *via* l'expression de ligands (FAS-ligand) qui vont favoriser l'apoptose des cellules exprimant FAS, soit *via* un système de molécules lytiques (Perforine/Granzyme) qui vont littéralement « trouser » la cellule cible et induire la nécrose de façon analogue aux NKs.

Il existe deux types de LB. Les LB1 sont capables de reconnaître un Ag indépendamment de l'aide des LT. Pour ce faire, la fixation de l'Ag au *B-cell receptor* (BCR) ainsi qu'un second signal est nécessaire à son activation. Il existe alors 2 types d'activation indépendante des LT. Dans l'activation de type 1, le second signal est fourni par l'activation des TLR par un de ses ligands. Dans l'activation de type 2, l'Ag est capable de fixer un nombre suffisamment important de BCR et c'est l'amplification du signal induit par le *crosslinking* de l'Ag par le BCR qui va servir de second signal.

Les LB2, dits « conventionnels » reconnaissent des Ag dépendant des LT. Un LB2 peut donner des PC à courte durée de vie dans le cas d'infections virales (via un second signal fourni par le TLR9, l'interféron (IFN) α et l'IL-6) puis une réaction de formation du CG. L'activation d'un LT CD4⁺ par une CDe va lui permettre d'exprimer des protéines de costimulation des LB, telles que CD40-ligand (CD154). Un LB folliculaire va rencontrer un LT CD4⁺ activé. Si le LB présente un BCR assez affin et que l'avidité entre le LT et le LB est suffisante (second signal formé par le complexe CD40/CD40-ligand par exemple), le LB folliculaire va proliférer dans le CG dans la zone sombre (ZS) à l'état de centroblaste. Les centroblastes effectuent la commutation isotypique du fragment constant de leur BCR sous l'influence de CD40 et diversifient leur répertoire par des réarrangements de leur BCR (hypermutation somatique, sous le contrôle de *Activation-induced deaminase* (AID)). Au terme de ce processus, les centroblastes de forte affinité sont sélectionnés positivement par les CDe folliculaires, capables de présenter des Ags natifs, et ceux de faible affinité meurent. Les LB folliculaires activés qui ne reconnaissent pas l'Ag sont alors repoussés vers le manteau. Au fur et à mesure de sa maturation, le centroblaste migre vers la zone claire (ZC) et se différencie en centrocyte capable de produire des LB mémoires et PC à longue durée de vie.

Au cours de la réponse immunitaire adaptative, une population spécifique de lymphocytes se développe. Leur rôle est de limiter l'inflammation. En effet, la destruction des tissus et l'effet synergique de production de cellules effectrices, si il n'est pas endigué, peuvent mener à une inflammation systémique chronique. Ces lymphocytes régulateurs, qu'ils soient LT ou LB, sont, entre autres, producteurs d'IL-10 et de *transforming growth factor* β (TGF- β) des facteurs capables de promouvoir l'anergie des cellules effectrices et ainsi, résoudre le processus inflammatoire lorsque la balance entre facteurs pro- et anti-inflammatoires est *a minima* équilibrée (**Figure 3**).

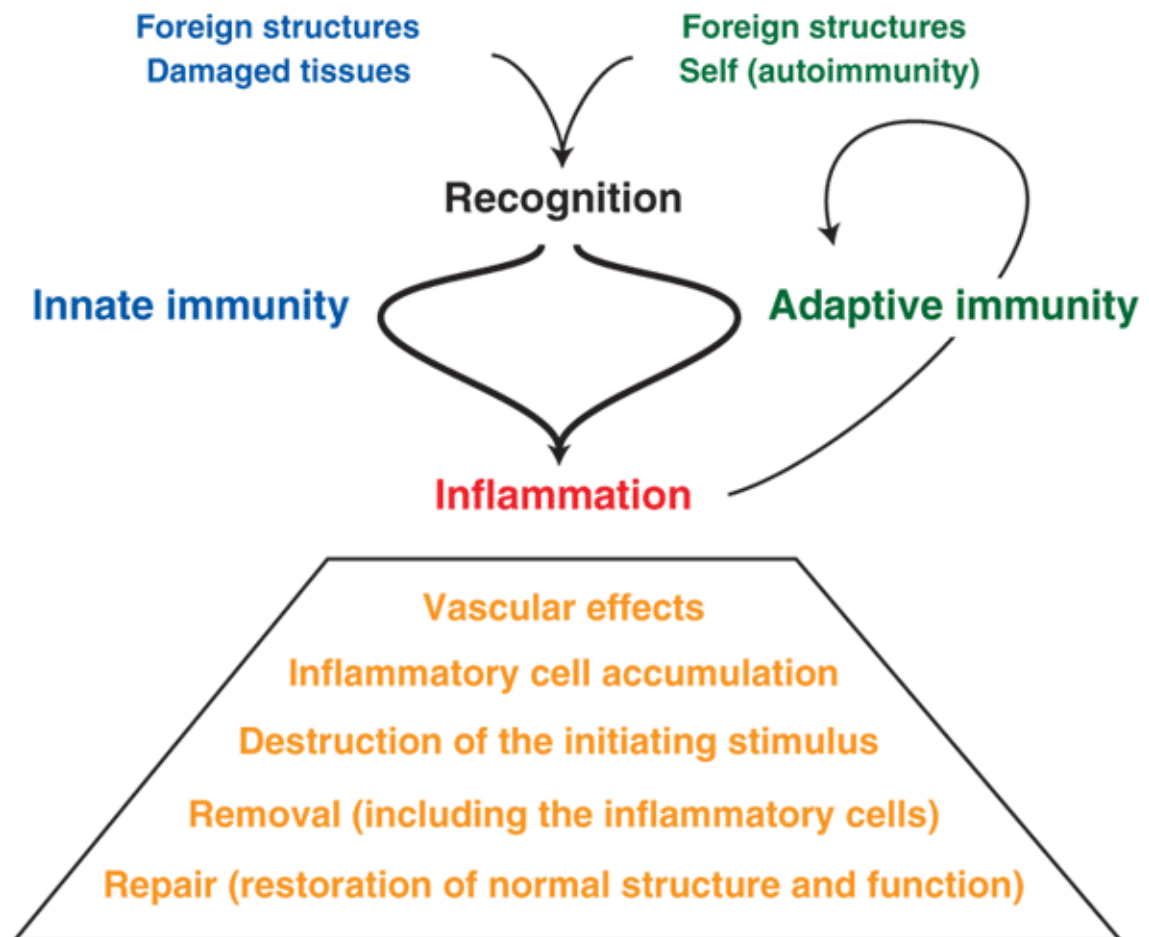


Figure 3 : Résumé des étapes du processus d'inflammation (Henson, 2005).

Au terme de ce processus, une partie des LB et LT au profil mémoire ayant été activés lors de l'agression vont être conservés et maintenus par l'organisme pour rejoindre des

organes tels que la moelle osseuse (MO) ou résider dans les OLS où ils pourront contribuer à la mémoire immunitaire en cas d'une réapparition du signal de danger généré par une cellule ou un tissu présentant les mêmes Ags que ceux qui les ont activés.

Ce tableau sommaire du fonctionnement du SI implique un très grand dynamisme de celui-ci et notamment, un rôle crucial du mouvement cellulaire. En effet, pour assurer efficacement son rôle, les intervenants leucocytaires doivent être à la fois produits en quantités suffisantes, mais aussi capables de rejoindre rapidement et précisément les sites d'inflammation et/ou d'activation. Aussi, tout au long de son ontogénie, un leucocyte a besoin d'être adressé au bon organe, retenu dans la niche ou la structure lui permettant une différenciation appropriée, et ce au moment opportun.

Le système des chimiokines (CK) et de leurs récepteurs (RCK) joue un rôle clef dans tout les processus liés à la migration cellulaire. Il n'est pas non plus à exclure que leur rôle s'étende à des fonctions cellulaires variées, telles que la prolifération, la survie et l'activation. Il est donc essentiel de comprendre leur implication dans l'étude des processus impliquant un positionnement cellulaire en conditions physiologiques et pathologiques.

Je présenterai dans un premier temps les processus homéostatiques de l'ontogénie lymphocytaire et l'implication des CK dans ceux-ci. Dans un second temps, je présenterai l'implication de l'axe de signalisation formé par le couple CXCL12/CXCR4 dans lesdits processus pour conclure sur l'implication de ce couple dans certaines pathologies.

2- Hématopoïèse

A- Cellules souches et niches hématopoïétiques

Il est démontré actuellement que tous les leucocytes dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun capable de produire toutes les cellules hématopoïétique après greffe : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH sont des cellules immatures, quiescentes, capables de se différencier dans tous les lignages médullaires, lesquels vont permettre la production de cellules matures retrouvées dans le sang ou les tissus. La mise en place des niches de CSH se fait par une organisation du stroma

médullaire qui va produire un nombre important de facteurs capables de maintenir les CSH dans un état de quiescence. Ces facteurs pouvant être de nature intrinsèque (gènes de la famille de Hox, modérateurs du cycle cellulaire) (Argiropoulos & Humphries, 2007; Matsumoto & Nakayama, 2013) ou extrinsèque (tel que le TGF- β).

La CSH se différencie progressivement par la perte de sa capacité pluripotente et l'acquisition de nouvelles potentialités, en progéniteurs intermédiaires, dont on décrit 2 types : un progéniteur myéloïde (qui a une potentialité erythro-thrombopoïétique) et lymphoïde. Il est décrit trois lignées de progéniteurs (**Figure 4**) :

- 1- Les progéniteurs érythro-thrombopoïétiques,
- 2- Les progéniteurs granulo-monocytaires
- 3- Les progéniteurs lymphoïdes communs (PLC)

Ces progéniteurs se différencient ensuite vers la production de cellules sanguines pour lesquelles ont été décrit cinq grands lignages :

- 1- le lignage érythropoïétique, qui est constitué des précurseurs des hématies
- 2- le lignage thrombopoïétique, qui se constitue des précurseurs des thrombocytes (plaquettes)
- 3- le lignage granulocytaire, composé des précurseurs des granulocytes (ou polynucléaires)
- 4- le lignage monocyttaire, qui aboutit à la production aux monocytes/macrophages et d'une fraction des CDes
- 5- le lignage lymphoïde pour les NK, LB, précurseurs des LT et l'autre fraction des CDes

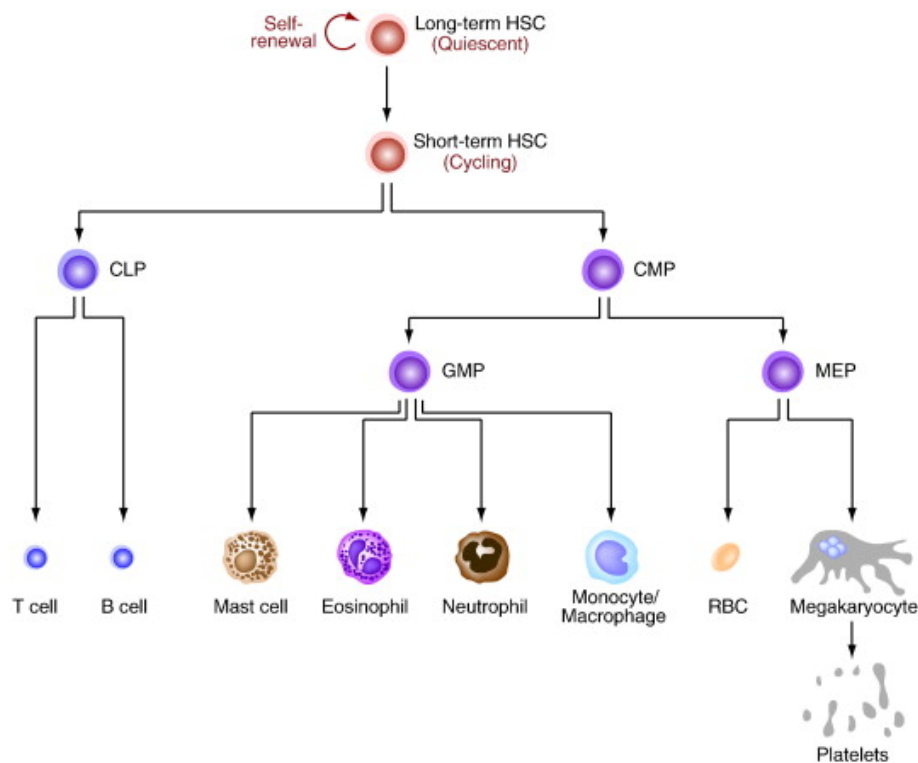


Figure 4 : Tous les éléments cellulaires du sang, dont les cellules du système immunitaire, dérivent des cellules souches pluripotentes dans la moelle osseuse (Matsumoto & Nakayama, 2013).

Si la MO est le siège de l'hématopoïèse de tous les lignages sus-cités, il existe une exception concernant la maturation des LT. En effet, les précurseurs des LT quittent la MO pour rejoindre le thymus qui est l'organe lymphoïde primaire (OLP) où ceux-ci se différencient en NKT, LT CD4⁺ ou CD8⁺.

Les processus de différenciation médullaire sont particulièrement complexes et donnent lieu à de nombreux débats. A ce jour, peu de notions sont consensuelles ; parmi celles-ci, le fait que le nichage des CSH et des progéniteurs nécessite une organisation structurée de la MO entre les différents emplacements. Ces niches distinctes concentrent un nombre de facteurs spécifiques (*colony-stimulating factors*) permettant la différenciation des cellules immatures. Dans ce contexte, une CK a été tout particulièrement étudiée car existant en grande quantité dans la MO mais exprimée différenciellement selon les niches considérées: *C-X-C motif ligand 12* (CXCL12). Son rôle est principalement de retenir les CSH et les progéniteurs dans les niches appropriées, mais aussi de promouvoir un état de

quiescence de ceux-ci, processus important afin d'éviter l'épuisement du réservoir de CSH.

Encore une fois, la notion de dynamisme de système est présente car il est établi qu'il existe un trafic des CSH et des progéniteurs entre les deux grandes niches décrites (Ding & Morrison, 2013):

- 1- La niche périvasculaire, est peu définie, mais semble impliquée dans la compartimentalisation des CSH et progéniteurs en cours de différenciation.
- 2- La niche endostéale ou ostéoblastique, une niche hypoxique où se logent les ostéoblastes et cellules mésenchymateuses qui maintiennent les CSH multipotents dans un état quiescent.

Au cours de leur ontogénie, les différents types cellulaires se déplacent, selon leur niveau de différenciation, dans ces différentes niches en présentant un profil d'expression de RCK et d'intégrines promouvant leur circulation intra-médullaire (Mazo *et al.*, 2011).

B- Ontogénie lymphoïde

a- Lymphocytes B

Les CSH s'engagent en PLC par l'expression d'Ikaros, un facteur de transcription (FT) indispensable au développement du lignage lymphoïde (Ferreiros-Vidal *et al.*, 2013). Les LB se différencient depuis les PLC pour s'engager à partir du stade des progéniteurs B (ProB) vers un devenir de LB (Hentges, 1994), notamment via l'expression des FT Pax5, E2A et PU.1 (Liao, 2009) (**Figure 5**). Ces progéniteurs expriment à leur surface la pseudo chaîne légère du BCR. Ce BCR est constitué d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde qui vont subir des réarrangements des *loci* VDJ (ou VJ pour les chaînes légères) ainsi que l'insertion aléatoire de nucléotides entre les jonctions par l'enzyme *terminal deoxyribonucleotidyl transferase* (TdT) qui permettra la production d'un répertoire plus diversifié. Durant le stade ProB, la chaîne lourde subit des réarrangements des *loci* VD, tandis que le précurseur B (PreB) donne lieu au réarrangement génique des *loci* VDJ, un processus dépendant des gènes RAG1 et RAG2. Le ProB exprime c-Kit à sa surface, une tyrosine kinase qui a pour ligand le *stem cell factor* (SCF).

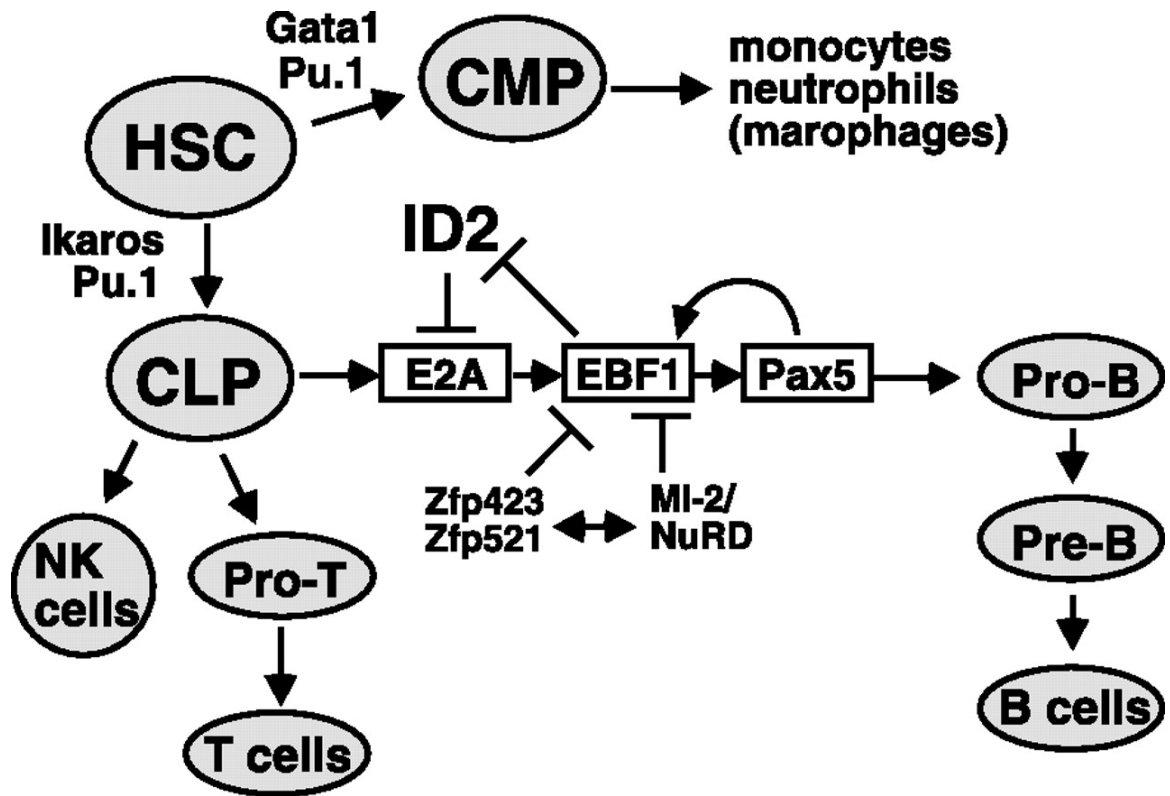


Figure 5: Facteurs de transcription nécessaires à l'engagement lymphocytaire B (Liao, 2009).

Lors de la fixation de SCF, le ProB va proliférer et se différencier en PreB qui va exprimer le récepteur à l'IL-7. La fixation de l'IL-7 à son récepteur va diminuer l'expression des molécules de surface du PreB et faciliter son détachement des cellules stromales qui lui servaient alors de socle pour sa maturation. Ce lymphocyte PreB, qui exprime un récepteur immature constitué de la pseudo chaîne légère et de la chaîne lourde réarrangée, va nécessiter d'autre réarrangement des *loci* VJ sur la chaîne légère pour donner un BCR constitué d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde réarrangée. La production d'un BCR fonctionnel est une première étape de sélection (positive) des LB. Les LB immatures coexpriment à la fois un BCR fonctionnel et un BCR composé de la chaîne lourde et de la pseudo chaîne légère. Une seconde étape de sélection a alors lieu pour éviter la production de clones autoréactifs : une sélection négative s'effectue lorsque les LB immatures sont capables de reconnaître les Ags membranaires avec une forte affinité. Ils sont soit éliminés, soit ils doivent à nouveau réarranger leur chaîne légère pour diminuer leur affinité vers les auto-Ags (*receptor editing*). Le LB immature

exprimant à sa surface un BCR peu spécifique constitué d'une immunoglobuline (Ig) de surface au large spectre de type IgM va rejoindre les sinusoides médullaires pour faciliter sa sortie vers les OLS (**Figure 6**).

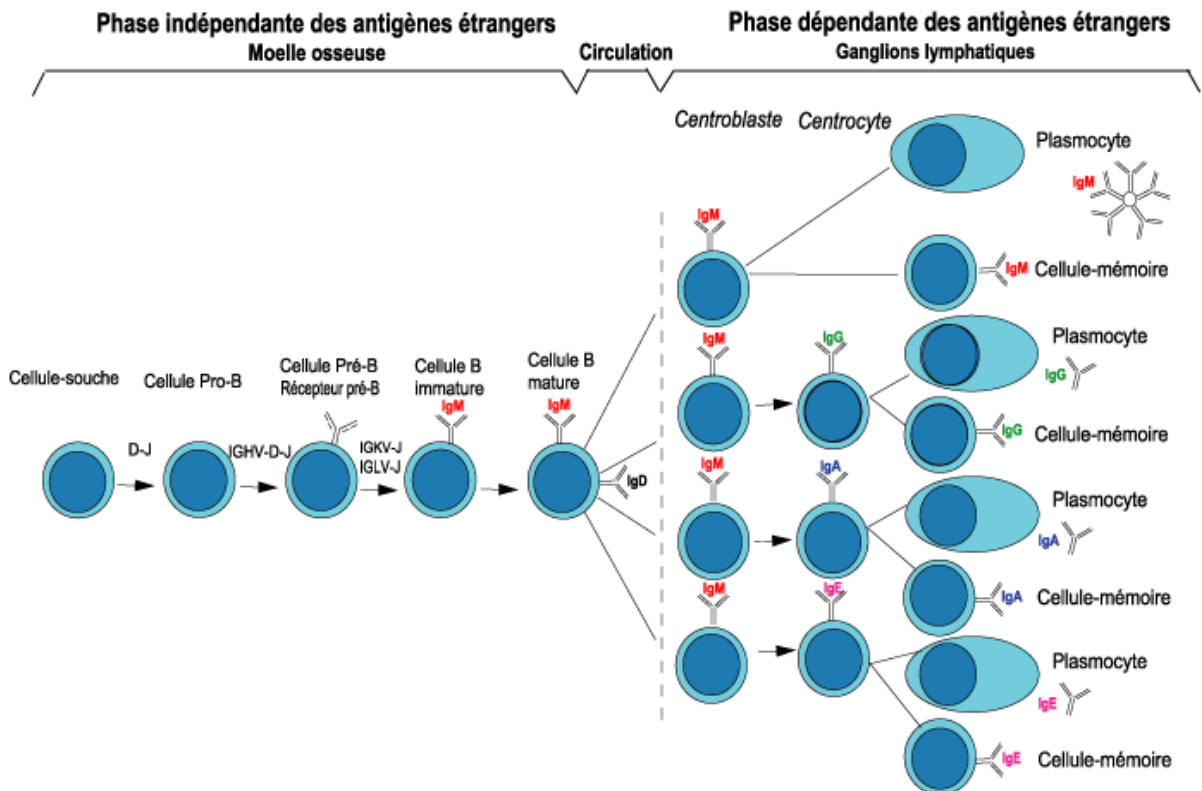


Figure 6 : Schéma de l'ontogénie lymphocytaire B (*International Immunogenetics Information System* ® <http://www.imgt.org/>).

b- Lymphocytes T

Les LT dérivent aussi des PLC, mais suivent une biologie différente. En effet, les *early thymic progenitors* (ETP) (Inlay *et al.*, 2009), une population spécifique de PLC, quittent la MO et sont capables de rejoindre le thymus en y entrant par les vénules cortico-médullaires (Roopen *et al.*, 2012) (**Figure 7**). Ces ETP, au phénotype double-négatif (DN, CD4⁻CD8⁻) vont ensuite se différencier sous l'effet de l'IL-7 soit en NKT, soit en LT, bien que l'existence d'un progéniteur NK spécifique ne soit pas exclue (Klein Wolterink *et al.*, 2010) (**Figure 8**). L'engagement vers une différenciation LT plutôt que NK se fait par l'expression du FT GATA3 (Hosoya-Ohmura *et al.*, 2011). La population

des DN se subdivise en 4 sous-populations distinctes en fonction des marqueurs phénotypiques CD25 et CD44.

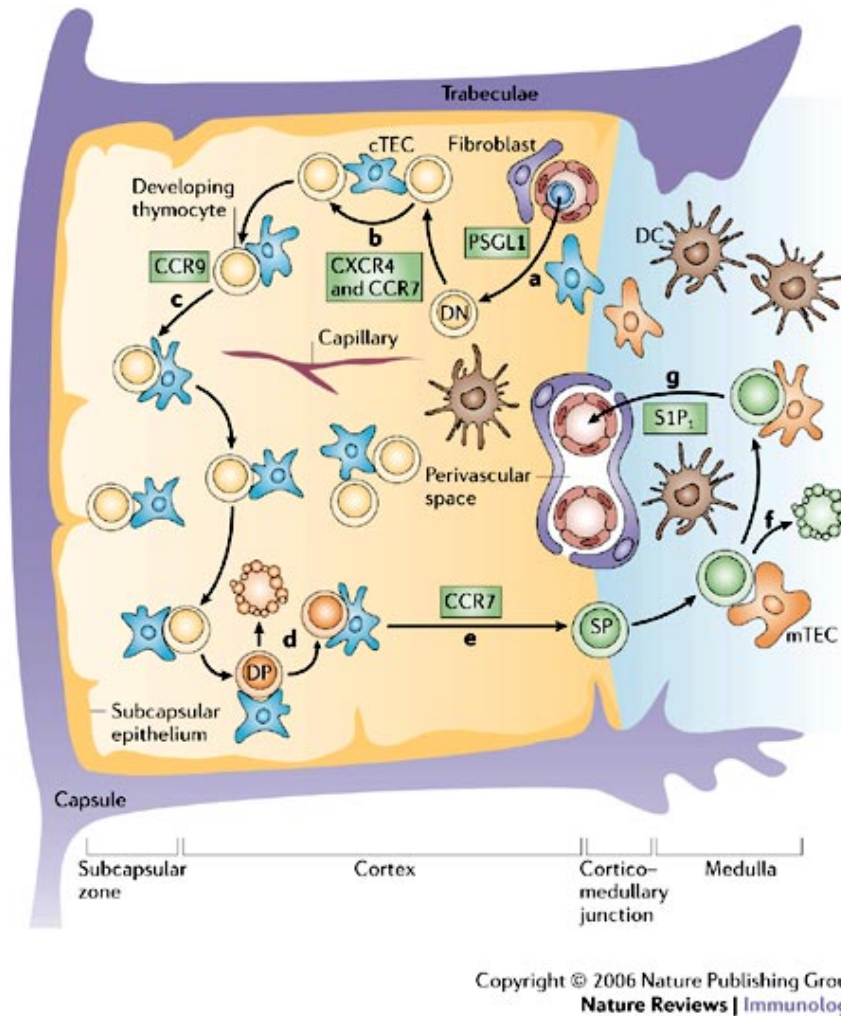


Figure 7 : Développement des lymphocytes T dans le thymus (Takahama, 2006).

La population la moins mature, DN1 ($CD44^+CD25^-$) est composée des ETP au potentiel NKT, mais recouvre aussi certaines populations non lymphocytaires. Cette sous-population migre vers la zone sub-capsulaire et se différencie en DN2 ($CD44^+CD25^+$) en commençant le réarrangement du *T-cell receptor* (TCR).

Le TCR peut se trouver sous plusieurs formes : le $TCR\gamma\delta$ associé à une population LT discrète, exprimant le CD3, mais ni le CD4, ni le CD8 et reconnaissant le CD1 (et non le CMH), et le $TCR\alpha\beta$ qui est le plus fréquemment retrouvé sur les NKT et LT

conventionnels CD4⁺ ou CD8⁺. De façon analogue aux LB, les chaînes α et γ sont codées par 2 gènes VD et les chaînes β et δ par 3 gènes VDJ.

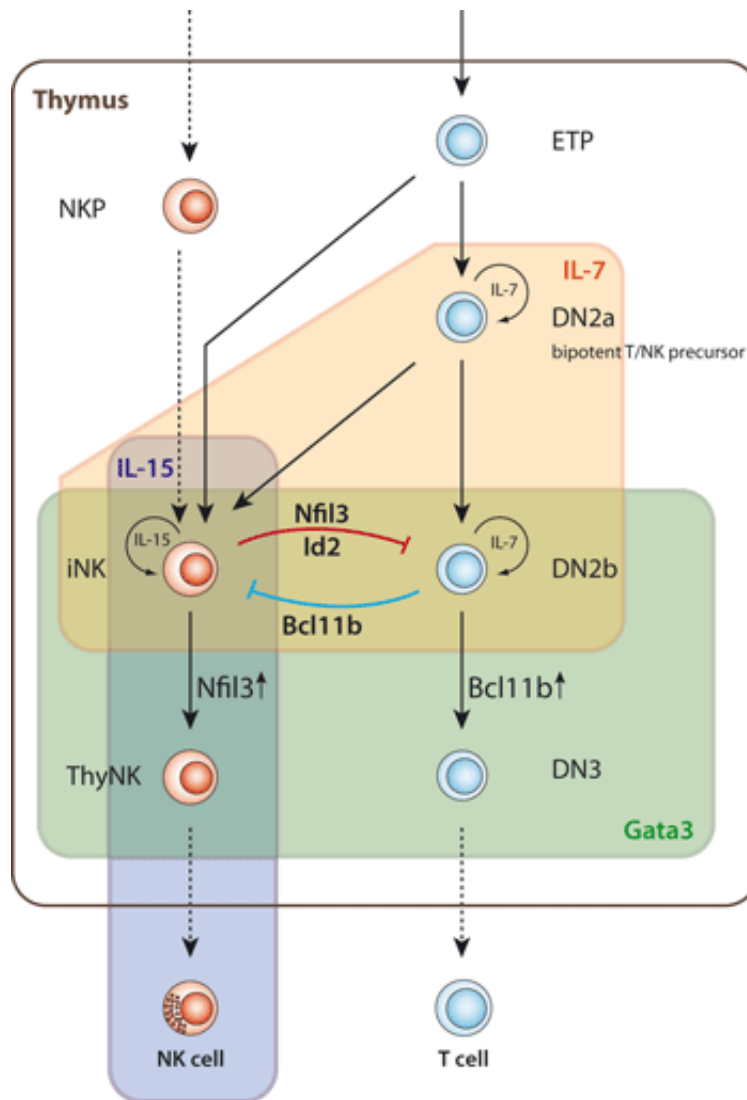


Figure 8: Développement des lymphocytes T et NKT depuis un progéniteur commun (Klein Wolterink *et al.*, 2010).

Le passage DN2-DN3 (CD44⁻CD25⁺) marque une première étape de sélection négative sur le modèle PreB où la sélection β a lieu. A ce stade, les LT ou NKT expriment une chaîne β ou δ fonctionnelle associée à une pseudo chaîne α ou γ et leur différenciation en DN4 nécessite la capacité de ces deux chaînes à s'assembler. Le stade DN4 (CD44⁻CD25⁻) correspond à un retour du futur LT ou NKT vers le cortex correspondant à la maturation

d'affinité du TCR où la chaîne α ou γ se réassemble avant de passer soit à un stade de $LT\gamma\delta$, soit à un stade de $NKT\alpha\beta$ soit à un stade de $LT\alpha\beta$ entrant dans des phases de sélection durant le stade double-positif (DP).

C'est durant la maturation DP que s'effectue la sélection clonale. Le stroma thymique présente des Ags du soi apprêtés dans un CMH. Si le LT est capable de reconnaître le CMH chargé avec une affinité intermédiaire, il recevra des signaux de survie et pourra poursuivre sa différenciation. S'il ne reconnaît pas de CMH chargé ou avec une trop faible affinité, il ne recevra pas de signal de survie et entrera en anergie. Si le LT DP reconnaît le CMH avec une trop forte affinité, il entrera aussi en apoptose. Les cellules qui survivent ont un répertoire diversifié qui reconnaît au hasard un peptide présenté par le CMH de type I ou bien de type II. C'est en fonction du type de CMH reconnu que le LT réprimera l'expression du CD4 ou du CD8. La reconnaissance d'un CMH de type II engagera sa différenciation en LT simple-positif (SP) naïf $CD4^+$ et d'un CMH de type I en LT SP naïf $CD8^+$ avant de migrer vers la medulla. Dans cette partie du thymus, des CDe spécifiques vont alors présenter des CMH chargés avec des peptides du soi mais d'origine non thymique *via* l'expression d'un FT *auto-immune regulator element* (AIRE). Il s'agit d'effectuer un contrôle qualité (sélection négative) des LT SP nouvellement générés et de vérifier s'ils sont capables de reconnaître le CMH chargé et si cette reconnaissance se fait avec une faible affinité, afin de supprimer les LT incapables d'interagir et ceux qui seraient autoréactifs. Il existe une population discrète de LT $CD4^+$ régulatrice qui dérive des LT DP et qui se caractérise par l'expression du FT Foxp3. L'émergence de cette population a plusieurs origines identifiées. En effet, il a été montré que les LT SP $CD4^+$ qui réagissent avec une intensité moyenne deviendraient des LT régulateurs (Benoist & Mathis, 2012). Une fois passé ce dernier processus de sélection, les LT vont rejoindre la jonction cortico-médullaire pour sortir du thymus.

c- Natural Killer

Les cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée impliqués principalement dans les réponses antivirales, antitumorales, antibactériennes et contre les parasites intracellulaires (Rouzair *et al.*, 2012). Elles disposent de deux fonctions effectrices : la cytotoxicité et la production de cytokines. La différenciation des NK se fait

principalement dans la MO, où ils dérivent des CSH mais il n'est pas clairement établi si ils dérivent du PLC ou si leur progéniteur se trouve encore en amont (Welinder *et al.*, 2011). En revanche, ces cellules nécessitent l'expression d'Ikaros, ce qui suggère qu'elles dérivent *a minima* d'un progéniteur engagé dans une voie de différenciation lymphoïde. Les cellules NK sont capables de lyser des cellules indépendamment de la présentation de l'Ag par un CMH. Leur pouvoir cytotoxique se met en place lorsque la balance penche vers les signaux des récepteurs activateurs (*killer activating receptors* (KAR)) au dépend de ceux inhibiteurs (*killer inhibitory receptors* (KIR)). Ces deux types de récepteurs appartiennent à la superfamille des Ig mais diffèrent dans leur région intracytoplasmique, qui présente des motifs de type *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) (activateurs) ou *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) (inhibiteurs). Si la nature des ligands des KAR est peu connue, les molécules du CMH de type I sont en revanche les cibles principales des KIR. Certains virus induisent une diminution de l'expression du CMH de type I pour échapper aux LT CD8⁺. Les NK sont sensibles à cette diminution d'expression et sont ainsi capables de lyser les cellules infectées.

3- Différenciation périphérique

A- Sortie des organes lymphoïdes primaires

Pour effectuer leur fonction en périphérie, les lymphocytes immatures doivent dans un premier temps quitter leur OLP, *via* des systèmes de sortie spécifiques à chaque organe (sinusoïdes médullaires ou jonction cortico-médullaire thymique) (Nagasawa, 2006; Takahama, 2006). Ce processus repose sur la capacité de la cellule à pouvoir diminuer l'expression de molécules de surface capables de maintenir une adhésion sur les cellules stromales, mais aussi de pouvoir percevoir un gradient de facteurs capables de l'attirer vers le sang. Les LT naïfs diminuent l'expression de Cxcr4 au profit de Ccr7 afin de diminuer la rétention corticale induite par Cxcl12 et favoriser leur migration vers la medulla (Halkias *et al.*, 2013). Aussi, dans ce contexte, les RCK, mais aussi les récepteurs aux gradients lipidiques, tels que les *sphingosine-1-phosphate receptors* (S1PR), ont un rôle central dans la rétention des cellules immatures au sein de leur OLP et dans la libération des cellules matures dans la circulation (Hisano *et al.*, 2012).

B- Recrutement dans les organes lymphoïdes secondaires

Une fois que les LT naïfs et LB immatures quittent les OLP pour le sang, il est nécessaire qu'ils soient recrutés dans un OLS pour achever leur différenciation et acquièrent leurs fonctions effectrices. Le recrutement se fait par l'expression de sélectines (CD62L) et d'intégrines (LFA-1, α L β 2) qui sont capables d'arrêter les lymphocytes circulants (Campbell *et al.*, 2003) sur les *high endothelial venules* (HEV) des ganglions lymphatiques (GL). En revanche, les processus d'extravasation et de migration trans-endothéliale nécessitent la présence de CK et des RCK. En effet, l'inactivation du RCK Ccr7, dont un des ligands, *secondary lymphoid-tissue chemokine* SLC/Ccl21 est produit en abondance par les HEV (Bromley *et al.*, 2008), génère à la fois des altérations de l'entrée des LT et des LB (Forster *et al.*, 1999). De façon analogue, l'inactivation de Cxcr4 diminue l'entrée des LB et LT (Okada *et al.*, 2002). Cela souligne le rôle crucial de ces deux récepteurs dans l'entrée de ces lymphocytes dans les GL. L'entrée dans les plaques de Peyer (PP), en revanche, ne semble pas nécessiter ces deux récepteurs, mais est dépendant de Cxcr5 (Okada *et al.*, 2002) (**Figure 9**).

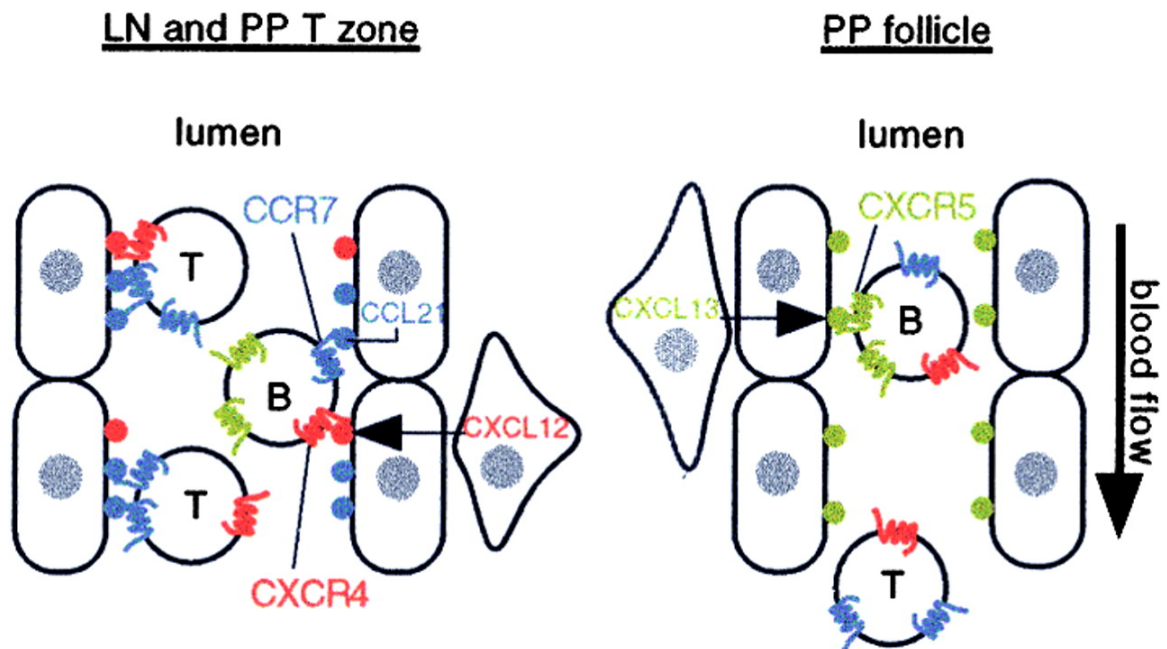


Figure 9: Conditions d'entrée des lymphocytes B et T dans les ganglions lymphatiques et plaques de Peyer *via* les chimiokines (Okada *et al.*, 2002).

Peu de choses sont connues sur l'entrée des lymphocytes dans la rate. Il a été suggéré que cette entrée se fait de façon passive grâce à l'irrigation de la rate par le flux sanguin *via* le sinus marginal et la pulpe rouge (Stein & Nombela-Arrieta, 2005). En revanche, il a été suggéré que la rétention au sein de cet organe se fait par Ccr7 et Cxcr5 (Cyster, 2005). On parle d'« empreinte » des RCK qui a pour effet de diriger spécifiquement un type cellulaire, à un niveau de maturation donné, vers l'organe particulier qui permettra sa différenciation en cellule effectrice.

C- Positionnement dans les organes lymphoïdes secondaires

Lorsque le lymphocyte est entré dans l'OLS, il doit alors se positionner correctement avec les autres lymphocytes pour pouvoir former des structures. On peut citer à titre d'exemple les follicules primaires : dans la rate, les LB se trouvent autour des LT, contrairement aux GLs, amygdales et PP, où les LT se trouvent autour des LB. Lorsque qu'un LB immature quitte la MO, il est recruté préférentiellement dans la rate, où, conjointement avec les LT, ils vont former des follicules primaires. Ces structures permettent aux LB/T de survivre, mais aussi de produire un ensemble de facteurs contribuant à une production non spécifique d'Ac. Lors de leur passage dans un follicule primaire, les LB matures folliculaires vont exprimer fortement Cxcr5 (Cyster *et al.*, 2000), favorisant leur agrégation dans des zones productrices de *B-lymphocyte chemoattractant* (BLC)/Cxcl13 qui joue un rôle dans la formation des CG (Deenick & Ma, 2011) et qui est exprimé dans les follicules B de tous les OLS (Gunn *et al.*, 1998). Les Ac dirigés contre les Ag dits « sanguins » sont majoritairement produits par les LB péritonéaux et les LB de la zone marginale (ZM) splénique. Ces LB présentent un BCR de large spectre et de faible affinité (type IgM) reconnaissant les Ag T-indépendants ; leur rôle est de fixer les Ag circulants et ils sont impliqués dans des processus tels que les hémolyses induites par des transfusions de culots érythrocytaires incompatibles. La cavité péritonéale est composée de trois types de LB : Les B1a, dérivant du foie fœtal, capables d'auto-renouvellement, les B1b, d'origine médullaire et les B2 (LB conventionnels). Il a été montré que pour les LB de la cavité péritonéale, les RCK Cxcr4 et Cxcr5 sont importants dans la rétention et la maintenance (prolifération augmentée et apoptose diminuée) de ces LB dans cette cavité (Berberich *et al.*, 2007; Foussat *et al.*, 2001).

L'origine des LB de la ZM est, comme pour les LB folliculaires, d'origine médullaire. Leur différenciation en LB de la ZM plutôt que folliculaire semble déterminée par la force du signal transduit par le BCR et son affinité (Pillai *et al.*, 2005). Dans la ZM, le mouvement des LB a été montré comme essentiel à leur survie. Ce mouvement circulatoire est directement lié avec CXCR4 et S1PR1 qui alternent séquentiellement leur expression à la surface du LB de la ZM (Arnon *et al.*, 2013). Dans les OLS, les LT vont circuler aléatoirement dans la zone T para-corticale, recherchant leur Ag (Stoll *et al.*, 2002). L'expression constitutive de Ccr7 sur les LT naïfs et de ses ligands Ccl19 et Ccl21 sur les CDe contribuerait à ces mouvements (Luther *et al.*, 2000). La forte expression de ces CK ne permet pas la production d'un gradient, mais plutôt de déterminer un périmètre limitant l'expansion de la zone T.

D- Activation

L'induction d'un signal de danger et l'apprêtement antigénique promeut la migration des CPAg des zones d'inflammation vers les OLS. Lors de cette migration, l'empreinte des RCK de la CPAg change et lui permet de rentrer dans l'OLS. Une fois dans l'OLS, les CPAg vont alors exprimer des CK telles que Cxcl16, une CK ancrée à leur membrane, qui a pour RCK Cxcr6, exprimé par les LT CD8⁺ naïfs et une partie des LT CD4⁺ effecteurs/mémoire (Matloubian *et al.*, 2000). Cet axe de signalisation favorise ainsi le contact entre LT et CDe et, de fait, la probabilité de rencontre entre un TCR spécifique et un complexe CMH-peptide (**Figure 10**).

Les CG sont des structures microanatomiques qui permettent la production de LB et PC spécifiques de l'Ag où se produit le processus de maturation d'affinité. Un nombre limité de clones LB forme les follicules dans lesquels ils prolifèrent (*B blasts*). Ils se dirigent ensuite vers l'extrémité adjacente à la zone T où ils rentrent au contact de LT exprimant le RCK Cxcr5, ce qui leur donne un tropisme pour la zone B productrice de Cxcl13 et leur permet d'échapper à l'influence de Ccr7. Les LB adoptent alors un phénotype de centroblaste et entrent dans un processus d'hypermutation somatique au sein de la ZS. Ce processus consiste en l'ajout de nucléotides aléatoires dans la région V codant pour les BCRs, permettant ainsi une plus grande diversité de BCR ayant un même réarrangement V(D)J des chaînes lourdes et légères.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

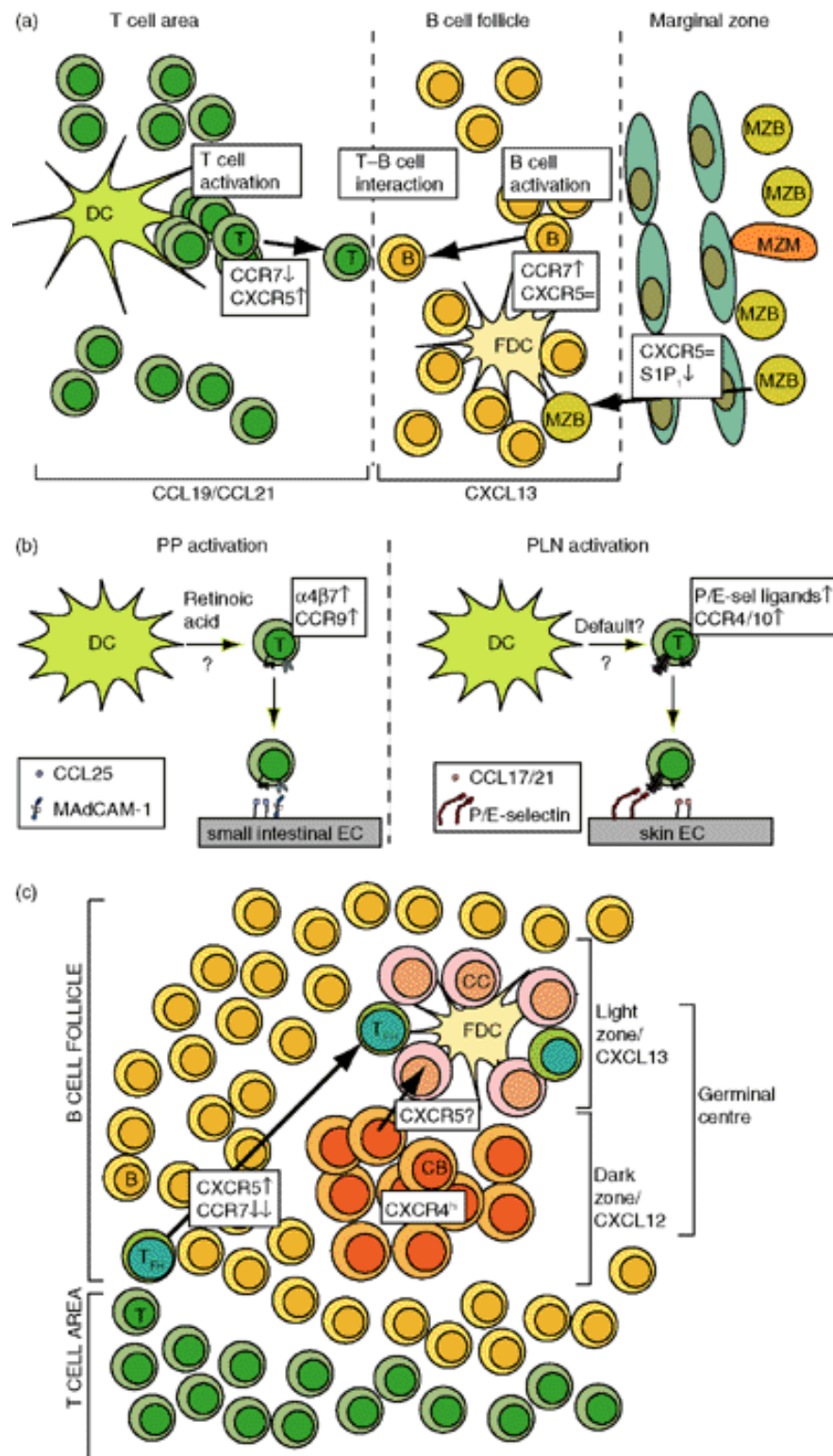


Figure 10 : Chimioquinas dans la mise en place de la réponse immunitaire (Stein & Nombela-Arrieta, 2005).

Bien que le processus de sélection ne soit pas clairement défini, les centroblastes capables de fixer l'Ag avec une forte affinité vont ensuite migrer vers la ZC, riche en CDe folliculaires et adopter un phénotype de centrocyte (les centroblastes autoréactifs, faiblement ou non réactifs, sont éliminés par apoptose). Les CDe vont permettre à ces centrocytes de capturer l'Ag et, sous l'influence des LT CD4⁺ environnants, vont soit devenir des PC, LB mémoires ou entrer à nouveau dans la ZS pour effectuer un nouveau cycle d'hypermutation somatique. A l'issue de cette différenciation, les LB vont alors procéder à une commutation isotypique de leur BCR. En fonction des signaux de costimulation reçus, pour modifier la classe de BCR exprimé qui, de classe IgM/IgD, va se commuter en IgG/IgA/IgE selon la modification du fragment constant de la chaîne d'Ig. Cette différence de classe va moduler la spécificité de la réponse immunitaire mise en place en fonction des récepteurs aux fragments constants qu'une cellule va exprimer. Par exemple, les IgE vont pouvoir se fixer aux récepteurs FcεR1 et FcεR2, exprimés par les polynucléaires basophiles et mastocytes qui sont des acteurs de la réponse antiparasitaire et allergique. Les LB mémoire vont conserver une capacité clonogénique de même que celle de différenciation en PC. Les PC, en revanche, sont des cellules productrices d'Ac (CPAc) ayant perdu leur capacité clonogénique produisant en continu des Ig commutés, spécifiques de leur Ag. La durée de vie des PC va dépendre de leur costimulation au moment de la rencontre avec l'Ag (McHeyzer-Williams *et al.*, 2009). En effet, il existe un second processus pouvant aboutir à la production de PC à courte durée de vie. La rencontre d'un Ag par le BCR d'un LB en dehors du CG, s'il est suffisamment immunogène ou que le LB possède un seuil d'activation faible, peut alors se différencier en PC capable de produire des Ac ; toutefois sa durée de vie est plus faible en comparaison de ceux produits par un CG.

E- Recrutement dans les sites inflammatoires

Une fois effecteurs, les LT cytotoxiques et certains LB spécifiques de l'Ag vont ensuite devoir ressortir de l'OLS et atteindre précisément le site d'inflammation. Pour cela, les LT (Zhi *et al.*, 2011) et les LB (Arnon *et al.*, 2013; Mok *et al.*, 2012), vont devoir sortir de l'OLS. Ce processus semble dépendant des S1PR. Ensuite, libérés dans la circulation, ils vont devoir reconnaître les sites d'inflammation dans les tissus non lymphoïdes.

Les RCK CXCR3 et CCR5 sont exprimés par les LT infiltrant les tissus dans de nombreux modèles (Boisvert *et al.*, 2003; Kunkel *et al.*, 2002). De même CXCR3 est exprimé par les PC qui sortent de la rate après activation (Hauser *et al.*, 2002). Les ligands de ces récepteurs sont nombreux, mais leur invalidation dans des conditions d'inflammation montre une diminution du recrutement lymphocytaire, ce qui met en avant leurs rôles dans le recrutement des LT et LB activés dans les processus inflammatoires.

D'autre part, les LT CD8⁺ et PC producteurs d'IgA vont se retrouver dans la cavité intestinale par un processus dépendant de CCL25, CK exprimée par les cellules épithéliales de la crypte intestinale. Ce phénomène est intéressant car il indique une sélectivité importante dans le type de cellules recrutées dans un tissu, même dans des conditions non inflammatoires (Hosoe *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2002).

4- Mémoire immunitaire

A- Domiciliation médullaire

Lorsque la phase effectrice d'immunisation est terminée, simultanément avec la fin de l'inflammation qui l'a générée, le SI met en place un processus de mémoire afin de pouvoir réagir de façon plus rapide et plus efficace à la réapparition de l'Ag déjà reconnu. Ce processus est appelé mémoire immunitaire.

Les populations LB mémoire et PC sont décrites comme ayant une durée de vie allant de quelques mois à plusieurs années. Les PC nécessitent une domiciliation médullaire pour pouvoir continuer à assurer leurs fonctions (McHeyzer-Williams & McHeyzer-Williams, 2005). En effet, la MO permet la survie des PC en offrant des niches spécifiques : les PC assurent ainsi leurs fonctions de CPAC (Chu & Berek, 2013).

La situation concernant les LT est similaire. En effet, les LT CD4⁺ (Tokoyoda & Radbruch, 2012; Tokoyoda *et al.*, 2009) et CD8⁺ (Becker *et al.*, 2005; Lambe *et al.*, 2011; Parretta *et al.*, 2005) présentent un tropisme préférentiel vers la MO dans laquelle ils sont capables de proliférer plus efficacement.

B- Survie et maintien

La MO est un site de domiciliation de la mémoire immunitaire pour les LT et PC. Elle attire les lymphocytes mémoire et présente des facteurs qui vont promouvoir la survie des PC dans leurs niches (Chu & Berek, 2013). Ceci est valable aussi pour les CD4⁺ (Tokoyoda *et al.*, 2009) et la prolifération des CD8⁺ (Becker *et al.*, 2005; Lambe *et al.*, 2011; Parretta *et al.*, 2005), bien qu'aucune niche LT médullaire ne soit actuellement décrite. Dans les trois cas, l'IL-7 produite par les cellules stromales joue un rôle important dans ces processus (Tokoyoda & Radbruch, 2012).

Le rôle de la CK CXCL12 est néanmoins discuté. En effet, la production importante de Cxcl12 par les cellules stromales médullaires pourrait être un facteur de migration des lymphocytes depuis le sang. Les PCs expriment CXCR4, mais l'inactivation lignage-spécifique de celui-ci ne perturbe pas la domiciliation de ces cellules (Nie *et al.*, 2004). De même, les LT CD4⁺ mémoires médullaires ne présentent pas d'augmentation de l'expression de Cxcr4 (Tokoyoda *et al.*, 2009). Ces résultats indiqueraient que sur ces cellules, les systèmes de CK/RCK ne joueraient pas un rôle central dans la migration lymphocytaire, mais un rôle dans le positionnement intra-médullaire vers les cellules productrices d'IL-7 et de fait, dans les processus de prolifération et d'apoptose.

II- Chimiokines et leurs récepteurs

1- Origine et rôle

Les CK sont des petites cytokines au pouvoir chimiotactique de faible poids moléculaire (8-12 kDa) initialement décrites comme pro-inflammatoires. Cependant, des études récentes ont démontré que leur rôle dépassait cette simple fonction : les CK jouent un rôle critique dans le développement (Raz & Mahabaleshwar, 2009) et les processus leucopoïétiques (Zlotnik & Yoshie, 2012).

La particularité de l'interaction entre les CKs et leurs récepteurs vient de la redondance, car une CK peut fixer plusieurs RCK, et de la polygamie, car RCK peut fixer plusieurs CK entre eux (Chu & Berek, 2013; Nomiya *et al.*, 2010) (**Table 1**). Cela pose un problème lors du développement de molécules spécifiques d'une CK ou d'un RCK qui présente un effet *in vitro*, mais un échec lors des essais cliniques (Allegretti *et al.*, 2012).

De plus, la présence de plusieurs RCKs à la surface d'un type cellulaire cause une redondance biologique, mais n'implique pas nécessairement une redondance fonctionnelle (**Figure 11**). Par exemple, lors de l'étude des RCK CCR2 et CCR5 dans l'infection au *West Nile virus* (WNV), il a été fait état que ces deux récepteurs partagent certains ligands (redondance biologique). L'infection par le WNV génère méningites et encéphalites chez les individus susceptibles. L'encéphalite est caractérisée par l'infiltration de leucocytes dans le système nerveux central (SNC). Bien que CCR2 et CCR5 soient impliqués dans ce recrutement durant l'infection, CCR2 est impliqué dans la libération de monocytes depuis la MO tandis que CCR5 est important dans le recrutement des monocytes depuis le sang vers le SNC (Lim et al 2006, 2011). Ainsi, ces récepteurs démontrent une coopération fonctionnelle, et non une redondance fonctionnelle, malgré leur redondance biologique.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Table 1. Human and Mouse Chemokines

Chemokine	Other Names (Human)	Category	Gene Symbol		Other Names (Mouse)	Receptor	
			Human	Mouse ^a		Agonistic	Antagonistic
CXC Subfamily							
CXCL1	GRO α , MGSA	I, ELR	<i>CXCL1</i>	<i>Cxcl3^b</i>	Gm1960	CXCR2	
CXCL2	GRO β	I, ELR	<i>CXCL2</i>	<i>Cxcl2</i>	MIP-2	CXCR2	
CXCL3	GRO γ	I, ELR	<i>CXCL3</i>	<i>Cxcl1^b</i>	KC	CXCR2	
CXCL4	PF4	Pt, non-ELR	<i>PF4</i>	–		CXCR3-B	
CXCL4L1	PF4V1	Pt, non-ELR	<i>PF4V1</i>	<i>Pf4^b</i>		CXCR3-B	
CXCL5	ENA78	I, ELR	<i>CXCL5</i>	–		CXCR2	
CXCL6	GCP2	I, ELR	<i>CXCL6</i>	<i>Cxcl5^b</i>	LIX	CXCR1, CXCR2	
CXCL7	NAP-2	Pt, I, ELR	<i>PPBP</i>	<i>Ppbp</i>		CXCR1, CXCR2	
CXCL8	IL-8	I, ELR	<i>IL-8</i>	–		CXCR1, CXCR2	
CXCL9	MIG	I, non-ELR	<i>CXCL9</i>	<i>Cxcl9</i>		CXCR3	CCR3
CXCL10	IP-10	I, non-ELR	<i>CXCL10</i>	<i>Cxcl10</i>		CXCR3	CCR3
CXCL11	I-TAC	I, non-ELR	<i>CXCL11</i>	<i>Cxcl11</i>		CXCR3, CXCR7	CCR3, CCR5
CXCL12	SDF-1	H, non-ELR	<i>CXCL12</i>	<i>Cxcl12</i>		CXCR4, CXCR7	
CXCL13	BLC, BCA-1	H, non-ELR	<i>CXCL13</i>	<i>Cxcl13</i>		CXCR5, CXCR3	
CXCL14	BRAK	H, non-ELR	<i>CXCL14</i>	<i>Cxcl14</i>		unknown	
–	–	U, non-ELR	–	<i>Cxcl15</i>	Lungkine, Weche	unknown	
CXCL16	SR-PSOX	I	<i>CXCL16</i>	<i>Cxcl16</i>		CXCR6	
CXCL17	DMC	U	<i>CXCL17</i>	<i>Cxcl17</i>		unknown	
CC Subfamily							
CCL1	I-309	I	<i>CCL1</i>	<i>Ccl1</i>	TCA-3	CCR8	
CCL2	MCP-1	I	<i>CCL2</i>	<i>Ccl2</i>	JE	CCR2	
CCL3	MIP-1 α , LD78 α	I	<i>CCL3</i>	<i>Ccl3</i>		CCR1, CCR5	
CCL3L1	LD78 β	I	<i>CCL3L1</i>	–		CCR1, CCR3, CCR5	
CCL3L3	LD78 β	I	<i>CCL3L3</i>	–			
CCL4	MIP-1 β	I	<i>CCL4</i>	<i>Ccl4</i>		CCR5	
CCL4L1	AT744.2	I	<i>CCL4L1</i>	–			
CCL4L2	–	I	<i>CCL4L2</i>	–			
CCL5	RANTES	I, Pt	<i>CCL5</i>		<i>Ccl5</i>	CCR1, CCR3, CCR5	
CCL7	MCP-3	I	<i>CCL7</i>	<i>Ccl7</i>	MARC	CCR1, CCR2, CCR3	CCR5
CCL8	MCP-2	I	<i>CCL8</i>	–		CCR1, CCR2, CCR5	
–	–	I		<i>Ccl8^b</i>		CCR8 (mouse)	
CCL11	Eotaxin	D	<i>CCL11</i>	<i>Ccl11</i>		CCR3, CCR5	CXCR3, CCR2
–	–	I	–	<i>Ccl12</i>	MCP-5		
CCL13	MCP-4	I	<i>CCL13</i>	–		CCR2, CCR3	
CCL14	HCC-1	P	<i>CCL14</i>	–		CCR1, CCR3, CCR5	
CCL15	HCC-2, Leukotactin-1	P	<i>CCL15</i>	<i>Ccl9^b</i>	CCF18, MIP-1 γ	CCR1, CCR3	
CCL16	LEC, HCC-4	U	<i>CCL16</i>	–		CCR1, CCR2, CCR5, CCR8, H4	
CCL17	TARC	D	<i>CCL17</i>	<i>Ccl17</i>	ABCD-2	CCR4	
CCL18	PARC, DC-CK1	H	<i>CCL18</i>	–		PITPNM3	CCR3
CCL19	MIP-3 β , ELC	H	<i>CCL19</i>	<i>Ccl19</i>		CCR7	
CCL20	MIP-3 α , LARC	D	<i>CCL20</i>	<i>Ccl20</i>		CCR6	
CCL21	SLC, 6CKine	H	<i>CCL21</i>	<i>Ccl21a</i>		CCR7	CXCR3 (mouse)
–	–	H	–	<i>Ccl21b</i>		CCR7	
–	–	H	–	<i>Ccl21c</i>		CCR7	
CCL22	MDC	D	<i>CCL22</i>	<i>Ccl22</i>	ABCD-1	CCR4	

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Table 1. Continued

Chemokine	Other Names (Human)	Category	Gene Symbol		Other Names (Mouse)	Receptor	
			Human	Mouse ^a		Agonistic	Antagonistic
CCL23	MPIF-1	P	<i>CCL23</i>	<i>Ccl6^b</i>	C10	CCR1, FPRL-1	
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	H	<i>CCL24</i>	<i>Ccl24</i>		CCR3	
CCL25	TECK	H	<i>CCL25</i>	<i>Ccl25</i>		CCR9	
CCL26	Eotaxin-3	I	<i>CCL26</i>	<i>(Ccl26)</i>		CCR3, CX3CR1	CCR1, CCR2, CCR5
CCL27	CTACK, ILC	H	<i>CCL27</i>	<i>Ccl27a</i>		CCR10	
-	-	H	-	<i>Ccl27b</i>			
CCL28	MEC	H	<i>CCL28</i>	<i>Ccl28</i>		CCR10, CCR3	
XC Subfamily							
XCL1	Lymphotactin, ATAC, SCM-1 α	D	<i>XCL1</i>	<i>Xcl1</i>	lymphotactin	XCR1	
XCL2	SCM-1 β	D	<i>XCL2</i>	-		XCR1	
CX3C Subfamily							
CX3CL1	Fractalkine	D	<i>CX3CL1</i>	<i>Cx3cl1</i>	fractalkine, neurotactin	CX3CR1	

Abbreviations: I, inflammatory chemokines; H, homeostatic chemokines; D, dual chemokines; P, plasma or platelet chemokines that are activated by cleavage; Pt, platelet chemokines; U, unknown. Mouse genes whose human counterparts are reassigned by synteny analysis are highlighted by underline. H4, histamine receptor type 4; PIPNM3, phosphatidylinositol transfer protein membrane associated 3; FPRL-1, formyl peptide receptor like-1. ^aGenes appearing in parentheses are not expressed.

^bMouse gene whose human counterpart was reassigned after syntenic analysis.

Table 1 : Chimioquinas humaines et murines (Zlotnik & Yoshie, 2012).

Sur la **Figure 11-A**, on observe que malgré l'existence d'un ligand partagé par les deux RCK, il existe un « passage de relais » lorsque le mouvement est médié par le récepteur A, puis la synergie de A et B et enfin de B exclusivement.

Ce modèle nécessite en revanche une condition. Il faut que l'action du ligand c présente une capacité chimiotactique supérieure à celle de b sur A et B ou qu'il existe un rétrocontrôle biologique inhibant l'action de b sur A et/ou B. Ces processus de rétrocontrôle peuvent être de plusieurs natures :

- Diminution de la production de b sur son site
- Séquestration de b par la cellule via des RCK atypiques
- Internalisation du récepteur A
- Modulation de la signalisation intracellulaire *via* A ou B pour inhiber l'action de b

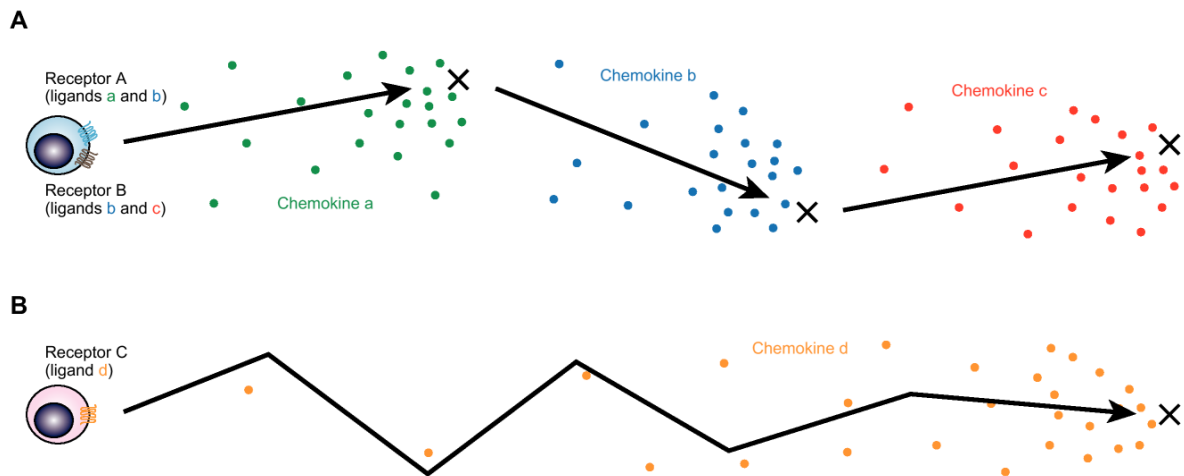


Figure 11: Non-redondance fonctionnelle du système des chimiokines. A. Les cellules expriment deux récepteurs A et B partageant certains de leurs ligands B. Les cellules expriment uniquement C (Nomiyama *et al.*, 2013).

Il existe néanmoins de rares cas où l'interaction entre CK et RCK n'est pas sujet à la redondance ou la polygamie (**Figure 11-B**). Ces cas sont conceptuellement plus commodes à étudier, car il ne s'agit que de considérer les processus biologiques affectant un récepteur et son ligand. Dès lors, les processus de multimérisation tant des CK que des RCK, qu'ils soient homo- ou hétérologues, jouent une place prépondérante (Thelen *et al.*, 2010).

2- Chimiokines

A- Classification structurale

Les CK se caractérisent par un motif commun en N-terminal de 4 cystéines (Cys) en position conservée. Ces acides aminés (AA) sont capables de former des ponts disulfures entre les Cys1 et 3 et les Cys2 et 4, ce qui confère une structure tertiaire caractéristique des CKs. La position des 2 Cys les plus proximales du N-terminal ainsi que le nombre d'AA variables (X) séparant celles-ci permet de classer les CK en 4 sous-familles et d'établir une nomenclature : CXC (groupe α), CC (groupe β), C (groupe γ) et CX₃C (groupe δ). La modélisation cristallographique des CK suggère que celles-ci ont la capacité de dimérisation ou d'oligomérisation à de fortes concentrations (Wang *et al.*,

2013). Cette interface de dimérisation implique respectivement la région N-terminale pour les CK CC et le feuillet $\beta 1$ pour les CK CXC. *In vitro*, cependant, la forme monomérique semble constituer la forme biologique la plus active aux concentrations requises pour obtenir des effets optimaux. *In vivo*, la fixation par les glycosaminoglycanes (GAG) permettrait leur oligomérisation et la modulation fine de leurs activités biologiques (Ravindran *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

B- Classification fonctionnelle

On peut distinguer deux grands types de CK :

D'une part, les CK « inductibles », dont une fraction présente un motif ELR (Glu/Leu/Arg), sont considérées comme ayant un pouvoir angiogénique et une autre fraction non-ELR comme angiostatiques (Keeley *et al.*, 2011). D'autre part, les CK « homéostatiques » sont constitutivement exprimées à la fois dans les organes lymphoïdes et non-lymphoïdes ; leur rôle se résume principalement à la migration de cellules, qu'elles soient lymphocytaires ou non (Mithal *et al.*, 2012; Zlotnik & Yoshie, 2012).

Il existe des CK possédant un double rôle. Celles-ci sont constitutivement exprimées dans certains tissus, mais montrent une surexpression dans des conditions inflammatoires. On parle alors de CK « mixtes ».

De par la complexité du système, il n'est pas exclu que certaines CK dites inflammatoires puissent jouer des rôles dans certains processus homéostatiques (Raman *et al.*, 2011), comme par exemple CCL2 dans le trafic monocytaire. Réciproquement, des CK homéostatiques peuvent jouer un rôle dans des situations d'urgence (Rueda *et al.*, 2012), telle que CXCL12 dans des modèles d'ischémie induite.

3- Récepteurs de chimiokines

A- Classification structurale

La spécificité d'action des CK est directement liée à la distribution cellulaire de leur(s) récepteur(s) cible(s). Les RCK font partie de la classe A (famille de la rhodopsine) des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines hétérotrimériques

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Gαβγ (RCPG). A ce jour, 23 gènes codants pour des RCK ont été mis en évidence chez l'homme et 24 chez la souris. A l'instar des CK, ils sont aussi groupés en 4 grandes familles en fonction des CK qu'ils reconnaissent (Nomiyama *et al.*, 2010; Zlotnik & Yoshie, 2012) (**Table 2**).

Table 2. Human and Mouse Chemokine Receptors

Human Gene Symbol	Other Names	Category	Mouse Gene Symbol	Ligands	
				Agonistic	Antagonistic
CXCR Subfamily					
CXCR1	IL-8RA	I	<i>Cxcr1</i>	CXCL6, CXCL7, CXCL8, acPGP	
CXCR2	IL-8RB	I	<i>Cxcr2</i>	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, acPGP, MIF	
CXCR3	GPR9	I	<i>Cxcr3</i>	CXCL4 (CXCR3-B), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CCL21 (mouse)	CCL11
CXCR4	LESTER, Fusin	H	<i>Cxcr4</i>	CXCL12, MIF, ubiquitin	
CXCR5	BLR1	H	<i>Cxcr5</i>	CXCL13	
CXCR6	STRL33, BONZO	H	<i>Cxcr6</i>	CXCL16	
CCR Subfamily					
CCR1	CC-CKR-1	I	<i>Ccr1</i>	CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23	CCL26
CCR2	CC-CKR-2	I	<i>Ccr2</i>	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16, β-defensin 2,3	CCL11, CCL26
CCR3	CC-CKR-3	I	<i>Ccr3</i>	CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28	CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18
CCR4	CC-CKR-4	D	<i>Ccr4</i>	CCL17, CCL22	
CCR5	CC-CKR-5	I	<i>Ccr5</i>	CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL8, CCL11, CCL16	CCL7, CXCL11, CCL26
CCR6	STRL22, GPR29	I	<i>Ccr6</i>	CCL20, β-defensin-2	
CCR7	EBI1, BLR2	H	<i>Ccr7</i>	CCL19, CCL21	
CCR8	TER1, GPR-CY6	H	<i>Ccr8</i>	CCL1, CCL8 (mouse)	
CCR9	GPR-9-6	H	<i>Ccr9</i>	CCL25	
CCR10	GPR2	H	<i>Ccr10</i>	CCL27, CCL28	
XCR Subfamily					
XCR1	GPR-5	D	<i>Xcr1</i>	XCL1, XCL2	
CX3CR Subfamily					
CX3CR1	V28, GPR13	D	<i>Cx3cr1</i>	CX3CL1, CCL26 (human)	
Atypical (Nonchemotactic, Recycling or Scavenger Receptors)					
CXCR7	RDC1, GPR159		<i>Cxcr7</i>	CXCL11, CXCL12	
CCBP2	D6		<i>Ccbp2</i>	CCL2, CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22, CCL23, CCL24	
CCRL1	CCX-CKR		<i>Ccr11</i>	CCL19, CCL21, CCL25, CXCL13	
CCRL2	HCR, CRAM		<i>Ccr12</i>	CCL19, chemerin	
DARC	Duffy		<i>Darc</i>	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL7, CXCL8, CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17	

Abbreviations: acPGP, N-acetyl Pro-Gly-Pro; MIF, macrophage migration inhibitory factor.

Table 2 : Récepteurs de chimiokines humains et murins (Zlotnik & Yoshie, 2012).

Malgré des différences dans leur structure primaire, les RCK présentent une structure tertiaire tri-dimensionnelle commune, composée d'une portion N-terminale extracellulaire, de 3 boucles extracellulaires (BEC), de 3 boucles intracellulaires (BIC) et d'un segment C-terminal intracytoplasmique. Ces RCK présentent une Cys en position N-terminale et

une Cys dans la 3^{ème} BEC qui permet la formation d'un pont disulfure indispensable à la liaison du ligand. Un second pont disulfure extracellulaire s'établit entre la première et la 2^{nde} BIC pour maintenir la conformation de la protéine. La 2^{nde} BIC présente un motif d'AA spécifique du couplage aux protéines G : le motif DRYLAIV (Asp/Arg/Tyr/Leu/Ala/Ile/Val), essentiel à la transduction du signal dépendant de l'activation des protéines G (Baggiolini *et al.*, 1997).

B- Classification fonctionnelle

Comme indiqué précédemment, une particularité du système des CK/RCK est la redondance et la polygamie du système. De manière générale, un RCK peut reconnaître et fixer plusieurs CK et une CK peut se fixer à plusieurs RCK. Cette polygamie est représentée de façon prépondérante pour les CK dites inflammatoires et leurs récepteurs cibles. *A contrario*, les CK dites « homéostatiques » semblent présenter une certaine sélectivité d'action avec leurs récepteurs cibles. La redondance, elle, se définit par le fait que plusieurs CK peuvent promouvoir une même réponse cellulaire. Individuellement, une même CK peut induire des activités biologiques variées telles que la migration, la prolifération, l'activation et jouer sur la différenciation. On parle alors de pléiotropie des CKs. L'avantage biologique de la redondance permet de compenser l'absence d'une CK ou sa production insuffisante, permettant ainsi un « passage de relais » d'un système à un autre. Il apparaît en outre que certaines CK fonctionnent aussi en tant qu'antagonistes d'autres RCKs (Zlotnik & Yoshie, 2012).

Il est intéressant de voir que ces exclusions mutuelles peuvent délivrer un message de façon synergique. Sur les LT CD4⁺, les RCK CXCR3 et CCR3, sous l'action de leurs ligands, sont capables d'induire une exclusion réciproque. Par exemple, les LT CD4⁺ à médiation cytotoxique expriment CXCR3, et l'activation de CXCR3 diminue l'expression de CCR3, qui est retrouvé sur les LT CD4⁺ à médiation humorale. La situation inverse est aussi vraie lorsque CCR3 fixe un ligand ; il induit alors une diminution de l'expression de CXCR3 (Sallusto & Lanzavecchia, 2000).

Enfin, des ligands de nature non chimiokiniques sont aussi capable de fixer des RCKs. *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF), une cytokine proinflammatoire a été montré comme étant capable de fixer un dimère formé par CXCR2 et CXCR4

(Bernhagen *et al.*, 2007) et de promouvoir une migration dépendante des intégrines, de même qu'avec CD74 et CXCR4 (Schwartz *et al.*, 2009) et signalisant via la phosphorylation d'AKT. De même l'ubiquitine extracellulaire (Tripathi *et al.*, 2013) est capable de fixer CXCR4 et de promouvoir une réponse chimiotactique. La gp120 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Lin *et al.*, 2003) fixe CXCR4 et est capable de promouvoir la fusion des membranes entre les cellules présentant CXCR4 et des cellules présentant le complexe gp120/gp41. Enfin, la protéine nucléaire HMGB1 peut interagir avec CXCL12 et promeut le recrutement des cellules mononuclée via CXCR4 (Schiraldi *et al.*, 2012).

Enfin, il existe une catégorie non conventionnelle de RCK dite « atypique », ceux-ci étant au nombre de 5. Ils sont décrits comme jouant un rôle dans la capture des CKs environnantes ou le transport de celles-ci plutôt que par un effet direct de la CK sur le récepteur et par une réponse cellulaire transduite par le RCK.

Ces RCK ne possèdent pas le motif DRYLAIV dans la 2nd BIC et de fait, sont considérés comme ne signalisant pas par un système dépendant des protéines G.

4- Signalisation et effets biologiques

A- Modèle de signalisation

Les RCK étant des RCPG, leur activation par un ligand est modélisé de la façon suivante. La CK fixe dans un premier temps le RCK qui va alors changer de conformation. Ce changement de conformation va permettre dans un second temps d'activer des protéines G et de mobiliser différents effecteurs intracellulaires pour transduire un signal menant aux différentes réponses cellulaires (motilité, survie, prolifération) (**Figure 12**) (Biajoux *et al.*, 2010; Bignon *et al.*, 2011; Duda *et al.*, 2011). Dans un troisième temps, des kinases spécifiques couplées aux RCPG, les *G-protein coupled receptor kinases* (GRK), vont être capables de cibler et phosphoryler des motifs de type sérine (Ser)/thréonine (Thr) qui se situent dans la région C-terminale. Ces événements de phosphorylation vont ensuite permettre le recrutement de protéines adaptatrices, les β -arrestines (β -Arr), qui vont elles aussi médier un signal cellulaire indépendant des protéines G, mais surtout permettre l'inactivation de la voie dépendante des protéines G et gouverner le trafic intracellulaire

Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

du RCK. Il n'est pas à exclure que la fixation d'une même CK génère des réponses différentes selon le RCK qui la fixe sur une même cellule (Lim & Murphy, 2011).

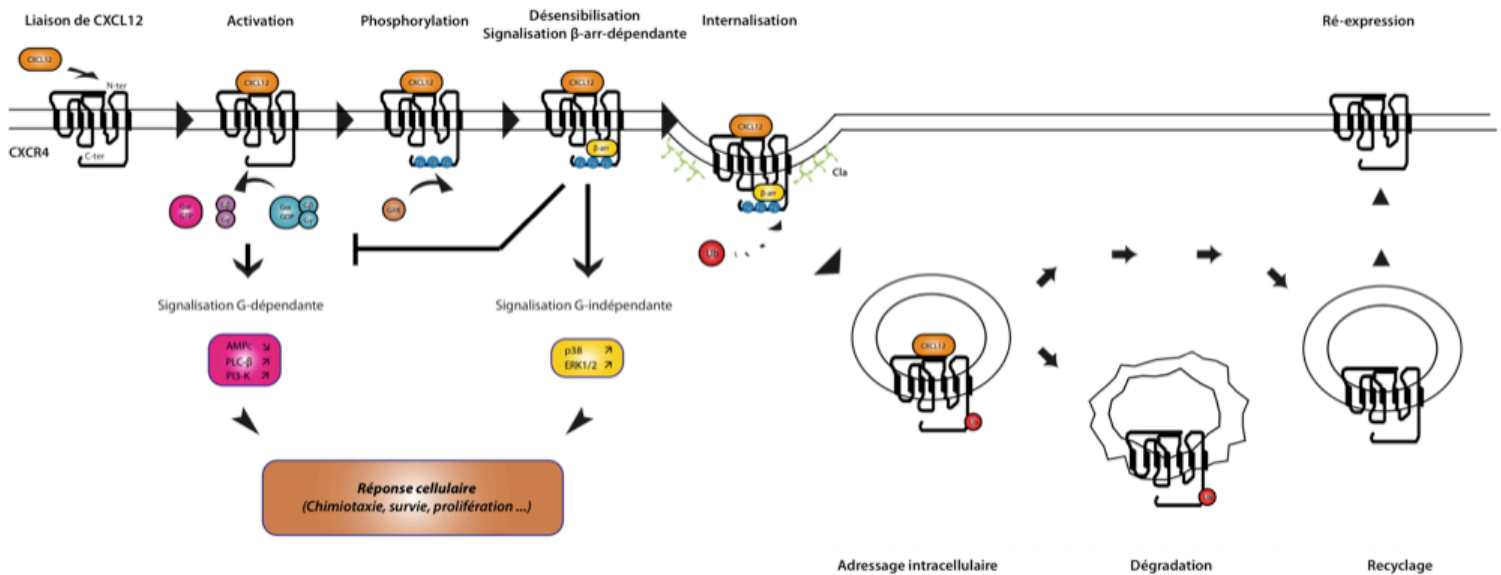


Figure 12 : Voies de signalisation et régulation de l'activité de CXCR4 (Biajoux *et al.*, 2010).

Durant l'inflammation, l'expression des CK est régulée en amont de façon transcriptionnelle (Gupta *et al.*, 1998), post transcriptionnelle (Fan *et al.*, 2005), notamment via l'ARN-interférence (Pillai *et al.*, 2010) et en aval de façon post traductionnelle. Leur caractère basique leur offre une forte propension à fixer les GAGs et composants insolubles de la matrice extracellulaire (MEC) de la cellule productrice ou de la cellule voisine.

Cette capacité à être maintenue par les GAGs est essentielle dans la formation du gradient et son abrogation génère des altérations de la motilité leucocytaire (Rueda *et al.*, 2012). *In vitro*, les activités biologiques des certaines CK sont régulées par clivage protéolytique de leur extrémité N-terminale ; les CKs subissant ce mécanisme sont alors dotées d'activités biologiques (agonistes ou antagonistes) différentes des formes natives, comme par

exemple l'inactivation de CXCL12 (McQuibban *et al.*, 2001) ou la modulation de l'affinité de CCL14 pour ses récepteurs (Richter *et al.*, 2009).

B- Eventail des réponses cellulaires

Les CKs régulent l'homéostasie leucocytaire à l'état basal et sont directement impliquées dans le recrutement des cellules effectrices au site d'inflammation. Le spectre d'action ne se limite pas seulement à cette fonction, mais est étendu à des rôles de modulation de la prolifération, la survie, la différenciation et l'activation cellulaire. Ces activités biologiques les impliquent donc dans les processus d'organogenèse, de compartimentalisation (notamment des tissus lymphoïdes), dans l'hématopoïèse, dans la régulation de la réponse immunitaire (initiation, résolution et maintien), dans l'angiogenèse, dans la tumorigenèse et dans les pathologies inflammatoires et infectieuses (Biajoux *et al.*, 2012; Corsiero *et al.*, 2012; Gouwy *et al.*, 2012; Patrussi & Baldari, 2011; Scholten *et al.*, 2012).

Une notion importante reste le concept d' « empreinte ». En effet, les différents événements de la vie de la cellule nécessitent un positionnement optimal de celle-ci. Par exemple, l'engagement du BCR ou du TCR active un lymphocyte qui va acquérir des fonctions effectrices. Afin de rejoindre les tissus inflammés ou contribuer au maintien de la mémoire immunitaire, il doit alors perdre son tropisme pour les OLS et adopter un profil migratoire lui permettant de rejoindre sa zone d'action (Kunkel & Butcher, 2002).

III- Le trio CXCR4, CXCR7 et CXCL12

1- CXCL12

A- Découverte

En 1994, le gène *Stromal cell-derived factor 1* (sdf-1) a été cloné chez la souris à partir d'ADN complémentaire de lignées stromales médullaires (Nagasawa *et al.*, 1994). Son produit SDF-1 ou *Pre-B-cell growth-stimulating factor* (PBSF) a été identifié comme facteur de croissance des cellules PreB *in vitro*. Il existe 3 isoformes identifiées chez la souris : Sdf-1 α (68 AA), Sdf-1 β (72AA) et Sdf-1 γ (98 AA) qui présentent 95% d'homologie d'AA entre les espèces et obtenues par épissage alternatif (Janowski, 2009;

Laguri *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2008). L'extrême conservation de la séquence entre les espèces suggère que SDF-1 est une CK primitive exerçant des fonctions physiologiques essentielles. Sdf-1 α et Sdf-1 β présentent un profil d'expression et des fonctions identiques. Le troisième variant, en revanche, présente une affinité accrue pour les GAGs et notamment les héparanes sulfates (HS) avec une affinité (Kd) de 93 (α), 25 (β) et 1,5(γ) nmol/L. Ce dernier variant est principalement retrouvé au cours du développement du système nerveux (Gleichmann *et al.*, 2000; Mithal *et al.*, 2012). En 1996, la forme humaine de SDF-1 a été clonée sur la base de sa version murine et identifiée comme un ligand-agoniste naturel de CXCR4/FUSIN (Bleul *et al.*, 1996a). Cette CK fixe spécifiquement CXCR4 et est un puissant inhibiteur de la fusion du VIH dans les LT CD4⁺ (Bleul *et al.*, 1996a; Oberlin *et al.*, 1996). La structure de SDF-1, ainsi que ses propriétés chimioattractantes font de SDF-1 une CK de la famille α : CXCL12.

De façon surprenante, le gène codant CXCL12 présente une région promotrice en 5' riche en îlots CG, similarité partagée avec les gènes de ménage, et est exprimé de façon constitutive à la fois dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes. Une autre particularité vient du fait que CXCL12 ne présente pas de motif ELR impliqué dans l'angiogenèse, dont l'absence est plus fréquemment retrouvée dans les CK de la famille β (CC) que la famille α (CXC). En effet, il a été montré dans des contextes tumoraux que le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *Platelet-derived growth factor* (PDGF)-D (Liu *et al.*, 2011) et CXCL12 sont capables de former une boucle de signalisation positive (Liang *et al.*, 2007), permettant à CXCL12 de favoriser un processus angiogénique de façon indirecte (Domanska *et al.*, 2013). Enfin, CXCL12 présente un motif Basique-Basique-X-Basique (BBXB) dans son premier feuillet β 1 caractéristique de la fixation aux HS (Santiago *et al.*, 2006) permettant la présentation de son site N-terminal à ses récepteurs.

B- Expression tissulaire

a- Constitutive

L'expression transcriptionnelle de *CXCL12* est constitutive dans de nombreux tissus hématopoïétiques et non-hématopoïétiques (Tashiro *et al.*, 1993), notamment dans les

OLP, OLS, les tissus embryonnaires et les neurones (Raman *et al.*, 2011). On retrouve son expression protéique dans le fœtus, soulignant un rôle précoce dans le développement, les activités neuronales (Mithal *et al.*, 2012), notamment dans les processus migratoires de ceux-ci, les OLP, les OLS, ainsi que les tissus extra-lymphoïdes. Chez l'adulte, les cellules stromales, épithéliales et endothéliales contribuent à la production de CXCL12. En ces termes, la CK CXCL12 est une CK dite « homéostatique ».

b- Inductible

L'expression de CXCL12 peut être modulée en réponse à de nombreux stress. L'hypoxie, via l'induction de *hypoxia inducible factor* (HIF) dans des modèles de polyarthrite rhumatoïde, les composants de traitements chimio-thérapeutiques (agents intercalants ou radiations ionisantes) et l'utilisation de *granulocyte colony-stimulating Factor* (G-CSF), un facteur de croissance médullaire ont été rapportés comme modulant positivement la transcription et l'expression de Cxcl12 dans la MO de souris (Heissig *et al.*, 2002; Hitchon *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2002; Ponomaryov *et al.*, 2000; Santiago *et al.*, 2011). La réaction à ce type de stress montre que l'organisme est capable de réagir à des dommages en promouvant l'expression de Cxcl12, ce qui implique une particularité des CK dites « inductibles ». Ce concept est renforcé par l'augmentation de la transcription splénique de Cxcl12 lors de l'infection par plasmodium chez la souris (Garnica *et al.*, 2002). Enfin, de nombreuses pathologies immunitaires ou cancéreuses montrent des dérégulations de l'axe de signalisation médié par CXCL12 (***c.f. chapitre V « L'axe de signalisation CXCR4-CXCL12 en pathologie »***). En prenant en compte ses expressions homéostatiques et induites, on peut considérer que CXCL12 est une CK dite « mixte ».

C- Régulation de l'expression et de la disponibilité

a- Transcription

A ce jour, peu de FTs ont été identifiés dans la modulation de l'activité de CXCL12. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF-1a, HIF-2), Nf- κ b, Slug et YY1 sont des FT régulant positivement l'expression de CXCL12. A l'inverse, PARP1 régule négativement

l'expression transcriptionnelle de *CXCL12* (Markovic *et al.*, 2013; Piva *et al.*, 2011). Enfin, la base de données GeneCard (<http://www.genecards.org>) indique la présence de sites possibles de promotion du gène pour CREB, STAT1, dCREB et STAT5A.

b- Interaction avec les GAGs

Comme d'autres CK, *CXCL12* est capable de s'associer aux GAGs à la surface des cellules productrices ou composants de la MEC. Les résidus Arg, Lys et His représentent 21% de la séquence de *CXCL12*, ce qui lui confère une forte polarité positive et un caractère basique permettant une forte association aux GAGs. De plus, 3 AA (Lys24-His25-Lys27) dans le feuillet $\beta 1$ permet la fixation aux HS via un motif canonique BBXB. Quant au domaine C-terminal, il possède un motif de liaison à l'héparine (His25-Lys27-Arg41) et est fortement impliqué dans l'interaction avec les composants de la MEC (Murphy *et al.*, 2007). D'autre part, la présentation de *CXCL12* par la laminine ou la fibronectine potentialise l'attraction des CSH (Peled *et al.*, 2000; Savino *et al.*, 2002). *In vivo*, la formation de gradients par ces interactions semble cruciale pour le maintien et le recrutement des cellules exprimant CXCR4 dans les sites cibles (Rueda *et al.*, 2012). Le domaine N-terminal reste néanmoins toujours libre pour sa fixation à CXCR4 via le motif RFFESH (Arg/Phe/Phe/Glu/Ser/His) (Crump *et al.*, 1997) et est accessible aux protéases (Sadir *et al.*, 2001) et à un second site de fixation à l'héparine (His17-Val18-Ala19) (Santiago *et al.*, 2006). Enfin, la fixation de *CXCL12* aux GAGs favorise sa présentation sous forme homodimérique, modulant ainsi ses actions biologiques (Drury *et al.*, 2011; Fermas *et al.*, 2008; Ziarek *et al.*, 2013).

c- Clivage protéolytique

La demi-vie de *CXCL12* plasmatique est faible (1 min), suggérant une régulation par protéolyse (Lambeir *et al.*, 2001). La cathepsine G, produite par les PNN et monocytes, clive les 5 AA N-terminaux de *CXCL12*. Ce processus inactive *CXCL12* et régule son activité *in vivo* (Delgado *et al.*, 2001). CD26 est aussi capable de cliver le motif N-terminal Lys1-Pro2, qui diminue fortement l'affinité de *CXCL12* pour CXCR4 et ses activités chimiotactiques et antivirales. (Shioda *et al.*, 1998). Il a été rapporté la capacité de CD26 à co-internaliser avec CXCR4, suggérant que CXCR4/CD26 forme une unité fonctionnelle (Herrera *et al.*, 2001). L'hémoplexine C, une métalloprotéase matricielle

clive, à l'instar de la cathepsine G, les 4 premiers AA de CXCL12. Enfin, l'élastase, une Ser protéinase produite par les PNN et surexprimée en réponse au G-CSF, clive le motif Lys1-Pro2-Val3 de CXCL12, neutralisant l'activité de CXCL12 et ayant pour effet la mobilisation des leucocytes et des CSH dans le sang. (Petit *et al.*, 2002; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2002). Ces activités protéolytiques permettent donc une inactivation rapide de la présence de CXCL12 extracellulaire, facilitant un échappement prompt à son pouvoir chimioattracteur et à une mobilisation vélocité des cellules exprimant CXCR4.

d- Régulation par les récepteurs atypiques

Le dernier mode de régulation de la disponibilité de CXCL12 pour CXCR4 se fait par la mise en compétition pour la fixation du ligand. En 2005, un récepteur orphelin, RDC-1, a été identifié comme capable de fixer CXCL12 avec une affinité 10 fois supérieure à CXCR4. Il a de même été montré qu'il signalisait de façon indépendante des protéines G après fixation de CXCL12 (Balabanian *et al.*, 2005a). Ce récepteur, entré dans la classification des RCK sous l'acronyme CXCR7, montre la capacité à fixer le CXCL12 extracellulaire et à l'internaliser pour le mener vers la voie de la dégradation. Cette action de « leurre » (*decoy*) permet de diminuer la concentration de CXCL12 accessible par CXCR4, notamment par la cellule exprimant CXCR4 et ainsi, soit de moduler les réponses cellulaires induites par CXCR4 (effet « seuil »), soit de favoriser la formation du gradient de CXCL12 (Wang *et al.*, 2012).

2- CXCR4

A- Historique

En 1993, le gène codant pour le récepteur sélectif de CXCL12 est cloné sous différentes appellations, dont la plus courante est *FUSIN*, co-récepteur de la fusion du VIH, avant d'être dénommé CXCR4 (Loetscher *et al.*, 1994). La protéine CXCR4 présente un poids moléculaire de 40 kDa et appartient à la famille 1 des RCPG. CXCR4 présente la particularité de ne fixer qu'un seul ligand de nature chimiokinique : CXCL12.

La séquence promotrice de CXCR4, contrairement à CXCL12 ne présente pas de motif de liaison à NF- κ B (Moriuchi *et al.*, 1997), mais d'autres FT modulent son expression, à savoir NRF-1, NRF-2, Foxc1, Foxc2, AP-1, Sp-1 ou Mash2 (Caruz *et al.*, 1998; Hayashi

& Kume, 2008; Kury *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2013; Wegner *et al.*, 1998). Il existe un variant non épissé de CXCR4, CXCR4-Lo, qui produit une protéine fonctionnelle différant de CXCR4 au niveau des 9 AA N-terminaux en allongeant le RCK de 4 AA (Gupta & Pillariseti, 1999).

En 1996, l'homologue murin, *pre-B-cell-derived chemokine receptor* (PB-CKR/Cxcr4), a été cloné et présente 91% d'identité de séquence avec la forme humaine (Nagasawa *et al.*, 1996b). Deux isoformes existent, issues d'un épissage alternatif, Cxcr4-A et Cxcr4-B, ce dernier étant tronqué en N-terminal (délétion de Val6 et Ser7). Ces deux isoformes coexistent naturellement, fixent Cxcl12 sur les LB, LT, cellules péritonéales, macrophages et thymocytes (Heesen *et al.*, 1997).

Au niveau structural, Cxcr4 diverge de la forme humaine au niveau des ectodomains (74% d'identité), principalement au niveau de la 2nde BEC (61% d'identité), présentant une insertion de 7 AA (Q181-G187). Contrairement à la forme humaine qui possède 2 sites de glycosylation (Asn11, Asn176) (Berson *et al.*, 1996), la protéine murine ne présente qu'un seul site de glycosylation, localisé en N-terminal. CXCR4 présente aussi trois sites de sulfatation Tyr7, Tyr12 et Tyr21, qui sont impliqués dans l'affinité de la fixation de CXCL12 sur le récepteur (Rapp *et al.*, 2013).

La région N-terminale et la dernière BEC, importantes dans la fixation du ligand, présentent 80% d'identité de séquence, ce qui permet au CXCL12 humain de fixer la forme murine de Cxcr4, et Cxcl12 murin de fixer la forme humaine de CXCR4. Cette proximité structurale a permis la production d'antagonistes spécifiques de CXCR4 efficaces dans les deux espèces (AMD3100). Les domaines transmembranaires et intracytoplasmiques présentent quant à eux 96% d'identité de séquence, dont le motif DRYLAIV de fixation des protéines G, et les sites de phosphorylation en C-terminal (**Figure 13**). Ce sont ces fortes identités inter-espèces qui permettent la modélisation de pathologies humaines chez la souris.

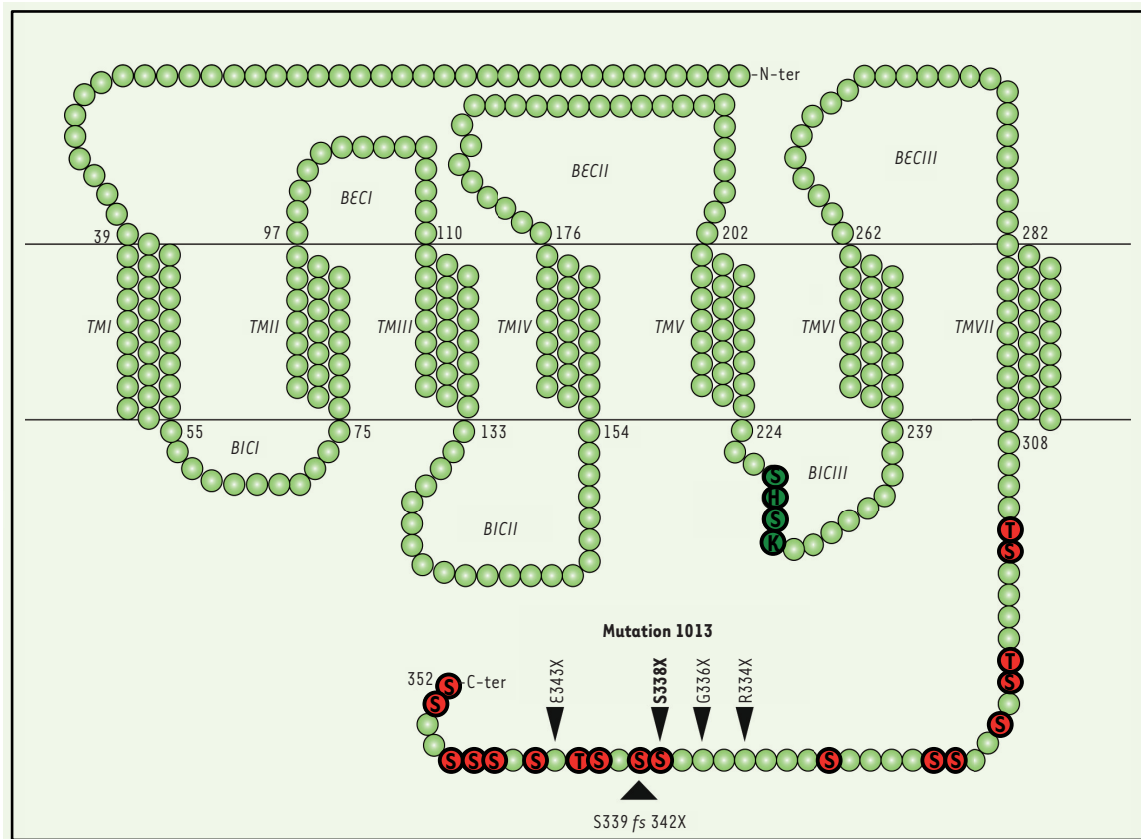


Figure 13 : Structure et séquence de CXCR4 (Bignon *et al.*, 2011).

B- Expression ubiquitaire

CXCR4 possède un très large spectre d'expression d'après la base de données *IUPhar* (<http://www.iuphar-db.org/>), notamment : intestin (Anton *et al.*, 2000), cerveau (Sehgal *et al.*, 1998), podocytes rénaux (Huber *et al.*, 2002), cellules médullaires stromales (Honczarenko *et al.*, 2006), testicules (Habasque *et al.*, 2002), cellules endothéliales (Gupta *et al.*, 1998) et leucocytes (Bleul *et al.*, 1996b).

Un rôle tout particulier dans l'embryogenèse a été souligné de par la létalité périnatale des souris invalidées pour le RCK ou le ligand, qui décèdent de malformations cardiaques (Nagasawa *et al.*, 1996a; Tachibana *et al.*, 1998), soulignant un rôle non substituable du couple dans l'organogenèse. CXCR4 est aussi étudié dans la formation des cancers, de par sa capacité à faire métastaser les cellules tumorales dans des sites de production de CXCL12. Le principal champ d'étude reste néanmoins l'hématopoïèse, où il est exprimé dans les CSH (Deichmann *et al.*, 1997) et durant l'ontogénie des LT, LB, NK, PNN

(Gouwy *et al.*, 2004), polynucléaires basophiles (Iikura *et al.*, 2001), CDe (Ayeahunie *et al.*, 1997) et plaquettes (Kowalska *et al.*, 1999).

C- Régulation de l'expression et de l'activité

a- Transcription et expression protéique

L'expression membranaire de CXCR4 est soumise à de nombreux modes de régulation induits ou non par des signaux extracellulaires distincts, notamment cytokiniques (Broxmeyer, 2008). Cette régulation transcriptionnelle est le principal mécanisme responsable de représentation protéique et membranaire de CXCR4.

Un point important réside dans le fait qu'au sein d'un même lignage, l'expression de CXCR4 varie en fonction de son niveau de différenciation. Par exemple, son niveau d'expression est variable sur les CSH selon leur phénotype et leur compartiment (Aiuti *et al.*, 1999; Voermans *et al.*, 2001). En effet, les CSH circulantes ou de sang de cordon présentent une expression de CXCR4 augmentée lorsque comparée aux CSH de la MO (Mohle *et al.*, 1998; Peled *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2001). Les LB sont aussi soumis à une expression sinusoïdale de CXCR4. Les cellules PreB présentent une expression élevée, les LB immatures une expression faible et augmentée chez les LB matures (Honczarenko *et al.*, 1999). Sur le plan fonctionnel, les cellules ProB et PreB présentent une réponse à CXCL12 plus élevée que les LB matures, indiquant le rôle prépondérant de CXCL12 dans les stades les plus précoces de l'hématopoïèse (Fedyk *et al.*, 1999). La même observation se fait sur les thymocytes murins, où l'expression de Cxcr4 augmente du stade DN jusqu'au stade DP, puis diminue de façon inversement proportionnelle à CCR7 chez les LT SP (Halkias *et al.*, 2013) pour diminuer leur rétention, favoriser leur sortie et leur tropisme ganglionnaire. On observe ainsi que dans les OLP, l'expression forte de CXCR4 est corrélée avec une activité chimiotactique forte et est responsable du maintien des stades les plus précoces durant leur différenciation. La diminution de l'expression et de la fonction, au fur et à mesure de la maturation est alors un prérequis à leur libération dans le sang.

b- Découplage expression/fonction

En périphérie, à l'opposé, une dissociation de l'expression et de la fonction de CXCR4 est associée à une distribution tissulaire des leucocytes, notamment sur les CSH ou les LB (Honzarenko *et al.*, 1999). Par exemple, les CSH mobilisées ou dérivées de sang de cordon expriment fortement CXCR4 comparativement aux CSH de la MO (Shen *et al.*, 2001). Cependant, les CSH médullaires répondent plus efficacement à CXCL12 et présentent une internalisation faible lorsque CXCL12 fixe son RCK. Ainsi, les processus de désensibilisation et de recyclage de CXCR4 pourraient moduler le tropisme des CSH pour certains sites spécifiques. *In vitro*, CXCL12 est connu pour exercer une action chimiotactique sur les LB circulants ou extraits des amygdales (Bleul *et al.*, 1996b; Vicente-Manzanares *et al.*, 1998). Les LB du CG expriment CXCR4, où il est impliqué dans la rétention au sein de la ZS (Caron *et al.*, 2009). Or, ces LB ne répondent pas à l'action chimiotactique de CXCL12 (Bleul *et al.*, 1998), ce qui indique que la fonction chimiotactique médiée par CXCR4 n'est pas totalement dépendante de son niveau d'expression membranaire, mais est modulée vraisemblablement par la signalisation intracellulaire. Enfin, les PC expriment CXCR4, et la fonction attribuée est celle de la domiciliation médullaire préférentielle de ceux-ci. Or, les souris invalidées de façon conditionnelle sur le lignage LB ont montré que l'absence de Cxcr4 ne module pas le tropisme médullaire des PCs (Nie *et al.*, 2004).

c- Désensibilisation

À la suite de la fixation de CXCL12 à CXCR4, deux phénomènes se produisent. Un changement conformationnel de CXCR4 déclenche l'activation des protéines G et la mobilisation de différents effecteurs intracellulaires impliqués dans la réponse cellulaire (exemple : la chimiotaxie). Ensuite, l'activation des protéines G est rapidement atténuée par un système de rétrocontrôle négatif, appelé désensibilisation, qui débute par des phosphorylations ciblant des résidus aminés de type Ser/Thr situés dans le domaine intracellulaire C-terminal du RCK par des kinases spécifiques, les GRK. Ces réactions conduisent au recrutement de protéines adaptatrices, les β -Arr, qui empêchent le couplage de CXCR4 à une nouvelle protéine G et qui connectent le RCK à de nouvelles voies de signalisation gouvernant notamment son endocytose. De nombreux travaux rapportent une fixation de la GRK-2 (Mueller *et al.*, 2013), GRK-3 (Busillo *et al.*, 2010), GRK-5

(Barker & Benovic, 2011) et GRK-6 à CXCR4. L'ensemble de ces travaux suggère une hiérarchisation des processus de phosphorylation de CXCR4 et une fonction différente de chaque GRK dans la désensibilisation et le recrutement de protéines adaptatrices au récepteur.

d- Internalisation, dégradation et recyclage

La phosphorylation du domaine C-terminal de CXCR4, en plus de favoriser son découplage au système de signalisation dépendant des protéines G, permet le recrutement de partenaires intracellulaires capables de promouvoir l'internalisation du RCK. La microscopie confocale a été un outil crucial à l'observation de ce phénomène, notamment sur les LT auxiliaires, où le RCK est, après fixation du ligand, délocalisé vers les puits de clathrine, internalisé et situé dans les compartiments endosomaux précoces (Signoret *et al.*, 1997). Ces récepteurs sont ensuite soit dégradés, soit recyclés à la membrane (Tarasova *et al.*, 1998). Le devenir du récepteur internalisé est un processus dépendant de l'ubiquitinylation de certains résidus (Lys et Ser) du C-terminal de CXCR4 (Bhandari *et al.*, 2009; Marchese & Benovic, 2001; Saini *et al.*, 2011).

L'incubation de CSH ou leucocytes durant des temps inférieurs à 45 min (temps nécessaire à la néosynthèse de récepteur) permet une détection augmentée du nombre de sites CXCR4, suggérant l'existence d'un réservoir intracellulaire de récepteurs rapidement mobilisables (Iikura *et al.*, 2001). La présence de ce réservoir intracellulaire dans ces cellules est due à une internalisation constitutive du récepteur (Zhang *et al.*, 2004). Ce processus jouerait un rôle dans la régulation du trafic intramédullaire des CSH nécessaire à leur différenciation en progéniteurs. Aussi, l'interférence que pourrait générer les cytokines sur la disponibilité de ce réservoir intracellulaire est un mode d'action proposé quant à la régulation de CXCR4 pour diriger les CSH dans les niches de différenciation appropriées dans un environnement fortement producteur de CXCL12.

e- Modifications post-traductionnelles

La forme membranaire de CXCR4 est soumise à diverses modifications post-traductionnelles. La modification des AA N-terminaux, notamment la sulfatation des Tyr et la O-glycosylation, joue un rôle dans la capacité des RCK à fixer leurs ligands (Farzan *et al.*, 1999; Rapp *et al.*, 2013). De même, la localisation de CXCR4 dans des radeaux

lipides, bien que sujet à controverse, semble jouer un rôle important dans ses capacités de signalisation (Contento *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 2005; Percherancier *et al.*, 2003; Popik *et al.*, 1998). Il convient de noter que la formation d'un complexe trimoléculaire entre la gp120 du VIH, CD4 et CXCR4 sur les cellules cibles serait prérequis à l'entrée du virus. Dans ce contexte, la présence de N-glycanes sur CXCR4 serait essentielle à la colocalisation de CD4 avec CXCR4 (Mbemba *et al.*, 2002) et le virus exploiterait préférentiellement les molécules situées dans les radeaux lipidiques pour l'entrée dans la cellule cible. Cela pourrait être un paradigme d'une nouvelle stratégie thérapeutique (Del Real *et al.*, 2002; Kamiyama *et al.*, 2009), même si des études récentes démontrent le contraire pour la colocalisation de CD4 et CCR5 (Gaibelet *et al.*, 2006).

La régulation protéasique de CXCR4 est enfin le mécanisme de régulation pouvant potentialiser certaines approches thérapeutiques de mobilisation leucocytaire. En effet, l'élastase produite par les PNN et monocytes ou encore la protéolyse induite par CD26 clive le domaine extracellulaire du récepteur et inhibe son interaction avec CXCL12 (Khurana *et al.*, 2013; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2002). Ces actions protéolytiques permettent une mobilisation rapide des cellules médullaires lors d'un stress dû à un dommage. Elles permettent la libération des cellules immunitaires effectrices de même que des cellules au potentiel réparateur depuis la MO (Kessenbrock *et al.*, 2011; Post *et al.*, 2012).

D- Deux modèles de signalisation

a- Séquentiel

La fixation du ligand CXCL12 sur son récepteur induit séquentiellement :

- Une modification de la conformation du récepteur
- Une activation des protéines G
- Une phosphorylation du domaine C-terminal (désensibilisation)
- Un recrutement des protéines adaptatrices de type β -Arr
- Une internalisation clathrine-dépendante
- Une dégradation ou un recyclage du récepteur à la membrane

C'est ce modèle qui prévaut quant au fonctionnement de CXCR4 et qui étaye, jusqu'ici, de nombreuses observations, notamment sur les anomalies dues à des pertes ou gains de fonction du récepteur en pathologie (*c.f.* **chapitre VI « CXCR4, Rôle étiologique de CXCR4 dans le Syndrome WHIM »**).

b- Simultané

Cependant, il existe aussi la possibilité d'un modèle où certains événements pourraient avoir lieu, non pas de façon séquentielle, mais simultanée (**Figure 14**). En effet, s'il est considéré que la voie dépendante des protéines G est la voie initiée et principale chronologiquement lors de la fixation du ligand au récepteur, il n'a jamais été démontré qu'il n'existe pas une balance entre la signalisation dépendante et indépendante des protéines G dès la fixation du ligand. En effet, il a été montré dans des conditions de surexpression que les protéines adaptatrices β -Arr sont capables de fixer un motif SHSK (Ser/His/Ser/Lys) dans la 3^{ème} BIC de CXCR4 et sont capables de ce fait, de promouvoir une réponse cellulaire *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) indépendante des protéines G (Lagane *et al.*, 2008) mais dépendante du domaine C-terminal (Pal *et al.*, 2013).

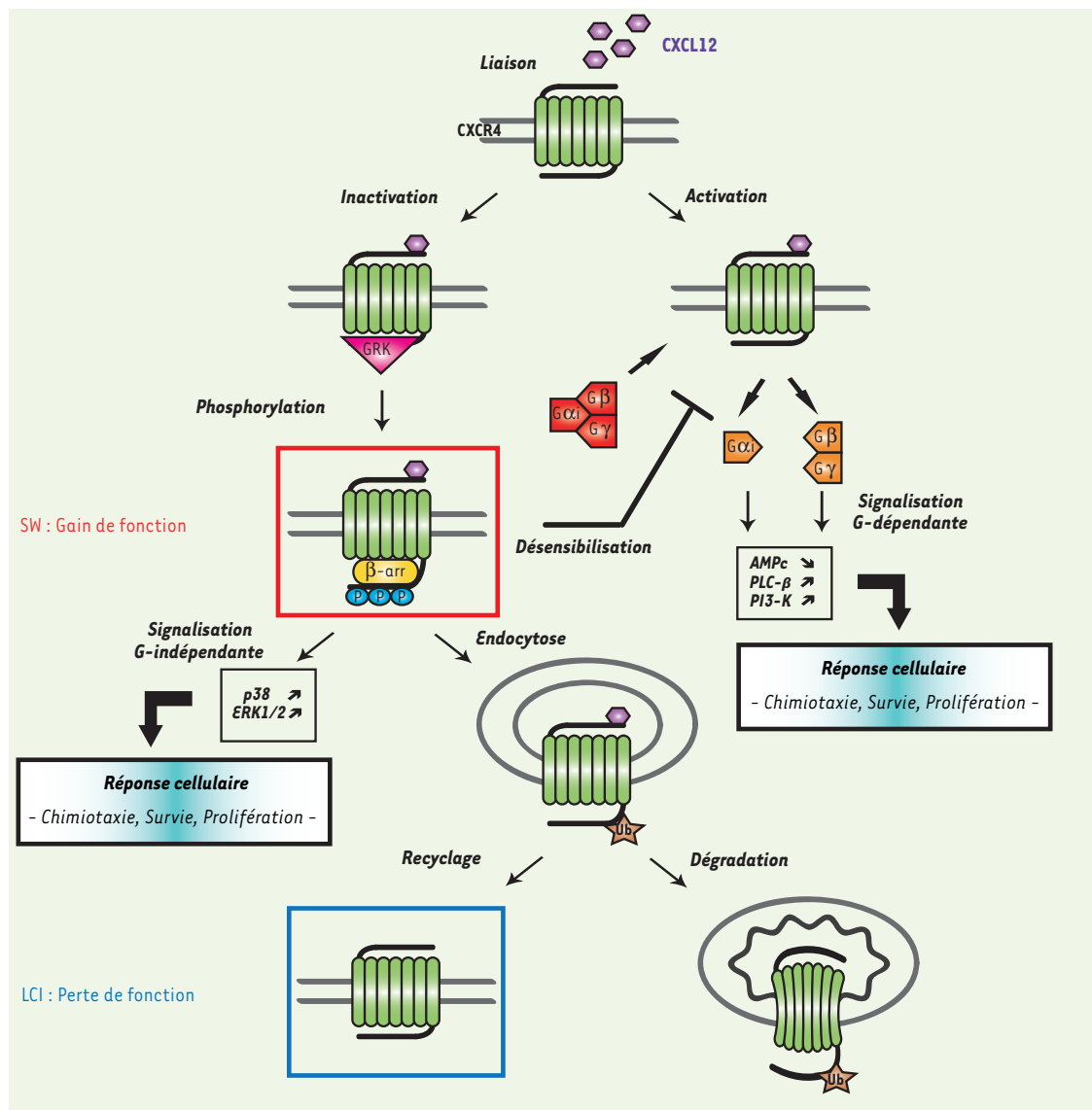


Figure 14 : Régulation de l'activité de CXCR4 (Bignon *et al.*, 2011). Le Syndrome WHIM (SW, en rouge) et la Lymphopénie T CD4⁺ Idiopathique (LCI, en bleu) sont deux pathologies altérant la désensibilisation et le recyclage de CXCR4.

E- Fonctions principales intégrées par CXCR4

a- Migration cellulaire

L'induction de la migration cellulaire constitue une propriété biologique commune aux CKs. Sous l'effet du gradient de CXCL12, les cellules exprimant CXCR4 se polarisent et réorganisent leur cytosquelette de façon à former des lamellipodes vers l'avant de la

cellule, où la concentration de CXCL12 est plus importante, et des pseudopodes à l'arrière de celle-ci (Wendel *et al.*, 2012). Durant le processus migratoire induit par CXCL12, les molécules d'adhésion telles que les intégrines $\alpha 4\beta 1$, VLA-4 et les protéines du cytosquelette sont délocalisées et redistribuées en des sites distincts de la cellule, permettant ainsi à la cellule cible de se mouvoir (Hartmann *et al.*, 2005; Parmo-Cabanas *et al.*, 2004; Sanchez-Madrid & del Pozo, 1999). Le processus d'induction du mouvement par CXCL12 est donc un processus coordonné, impliquant l'adhésion de la cellule à la MEC ou à l'endothélium, la formation d'une structure bipolarisée et la rétractation du pseudopode pour permettre à la cellule de se mouvoir.

b- Migration trans-endothéliale

CXCR4 est aussi capable de médier la migration trans-endothéliale des cellules (Ngo *et al.*, 2008). Il ne s'agit pas cette fois de diriger un mouvement migratoire sur une surface cellulaire, mais de promouvoir le déplacement au travers de cette surface. Ce processus s'avère important lorsque les leucocytes se trouvent en circulation et nécessitent alors une phase de ralentissement, d'arrêt et de diapédèse sur le modèle suivant (Gonzalez-Amaro & Sanchez-Madrid, 1999; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004) (**Figure 15**):

- Adhésion primaire transitoire et réversible : roulement du leucocyte sur la surface endothéliale, médiée surtout par les sélectines
- Activation leucocytaire rapide, dépendante des CK
- Adhésion ferme et stable à la surface endothéliale, contrôlée par les intégrines
- Diapédèse: le leucocyte rampe jusqu'à atteindre un espace inter-endothélial pour s'y glisser

Ce processus, aussi appelé processus d'extravasation, est crucial pour le recrutement leucocytaire dans les sites d'inflammation et notamment dans certaines pathologies auto-immunes ou les processus tumorigéniques (Domanska *et al.*, 2013; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004).

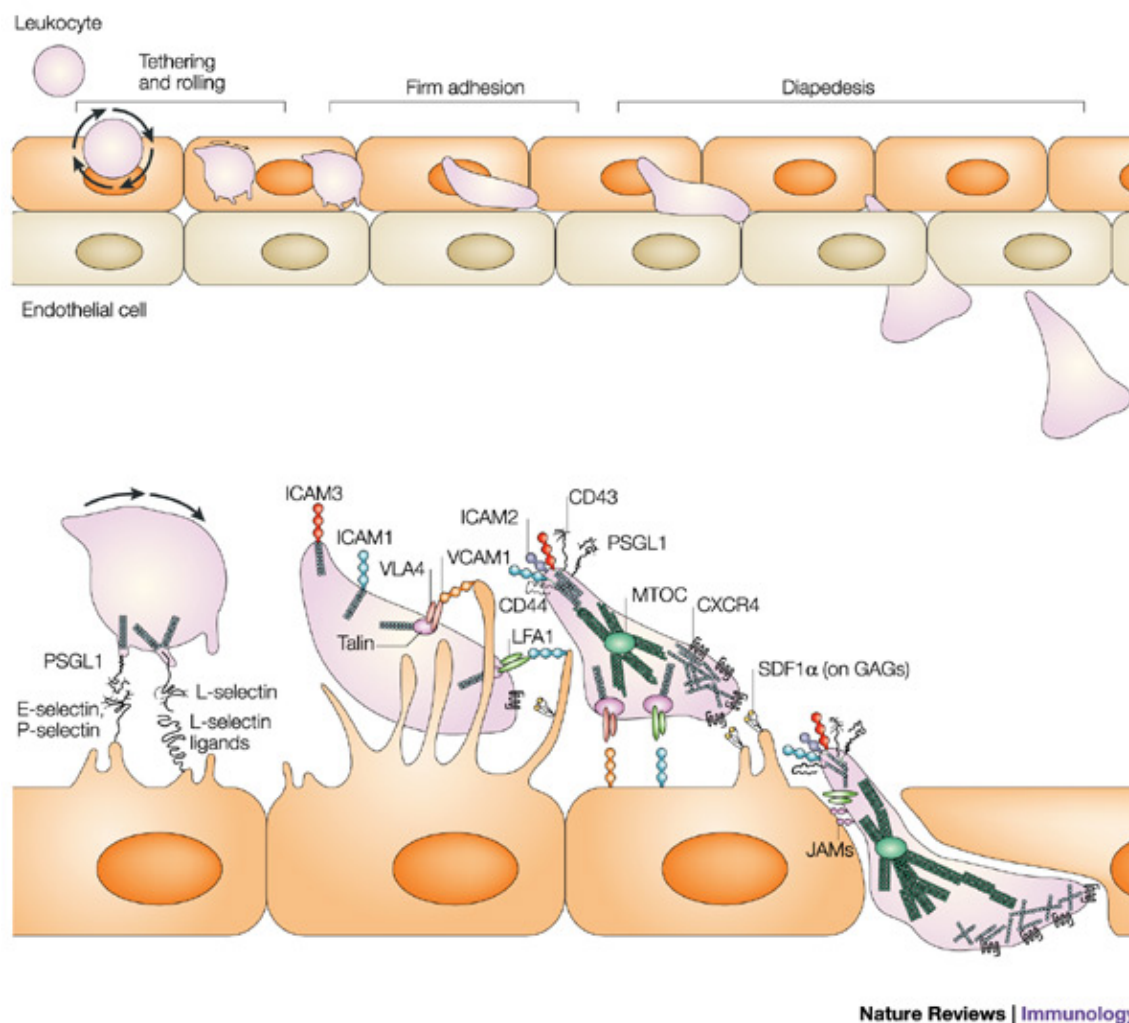


Figure 15 : Processus d'extravasation leucocytaire (Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004).

c- Quiescence des cellules souches

Au delà des processus de migrations cellulaires et trans-endothéliaux, CXCR4 est capable de médier des réponses cellulaires différentes, selon le lignage et le niveau de différenciation considéré. Une de ces réponses cellulaires est cruciale pour le maintien du système hématopoïétique : il s'agit de la quiescence des CSH, un processus médié entre autres par NRF-2 (Tsai *et al.*, 2013). Il a été montré qu'il existe une balance entre auto-renouvellement et quiescence des CSH et que l'abolition de l'expression de Cxcr4 sur ces cellules génère à la fois un relargage périphérique, une hyperprolifération cellulaire (Itkin

& Lapidot, 2011; Nie *et al.*, 2008) et une perte de la capacité clonogénique des CSH (Tzeng *et al.*, 2011) (**Figure 16**).

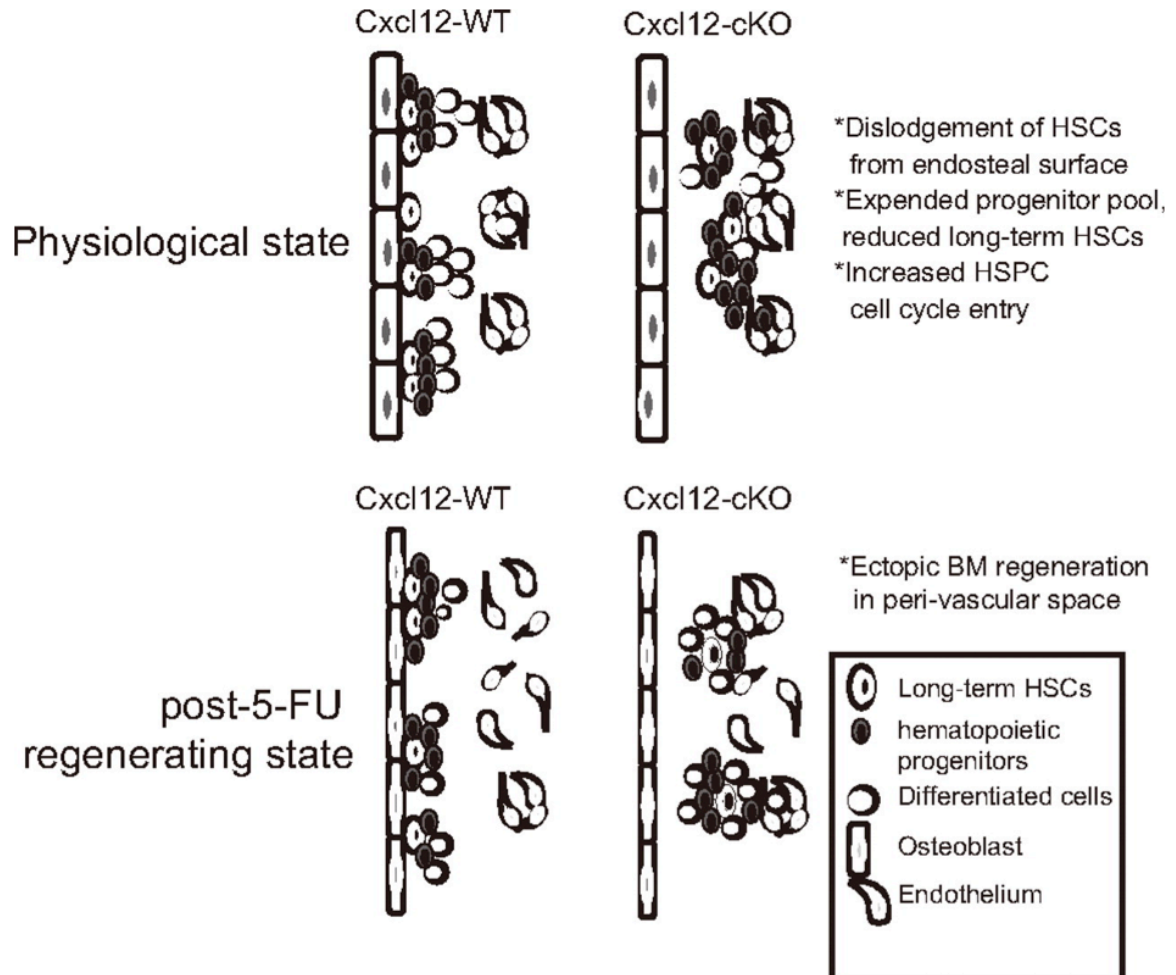


Figure 16 : Résumé des phénotypes médullaires des souris invalidées pour *Cxcl12* (Tzeng *et al.*, 2011).

d- Prolifération

A l'inverse, CXCR4 peut promouvoir la prolifération. En effet, les cellules PreB ainsi que les LB du péritoine présentent une prolifération accrue en présence d'une costimulation par CXCL12 (Balabanian *et al.*, 2002; Nagasawa *et al.*, 1996b). Cette action peut se faire d'une façon directe, *via* la transduction du signal médié par la PI3K/Akt (Ganju *et al.*, 1998; Minamiguchi *et al.*, 2001), mais aussi par la co-signalisation du BCR ou du TCR qui va favoriser la prolifération des LB et LT ayant leurs récepteurs engagés.

Enfin, il a aussi été montré que CXCR4 favorise la prolifération des cellules malignes, dans différents types de cancers, de façon autonome ou en modulant le microenvironnement tumoral (Domanska *et al.*, 2013).

e- Survie

Indépendamment des processus précédents, CXCR4 peut avoir une activité anti-apoptotique. Sur les thymocytes en cours de développement, il a été montré que Cxcr4 est nécessaire à la costimulation des thymocytes DN pour achever leur différenciation en DP (Tramont *et al.*, 2010) et que l'absence de Cxcr4 entraîne une apoptose exacerbée lors de la sélection β . Il a de même été montré que l'action de CXCL12 est capable de prolonger la survie des progéniteurs myéloïdes (Broxmeyer *et al.*, 2003). En pathologie, notamment dans certains cancers, CXCR4 est capable de promouvoir directement un effet anti-apoptotique sur les cellules tumorales l'exprimant, par exemple, *via* l'induction de Nf- κ b (Teicher & Fricker, 2010; Wang *et al.*, 1996).

f- Transcytose de Cxcl12

Enfin, un dernier processus de CXCR4 a été suggéré dans la MO. Le RCK est capable d'effectuer la transcytose de son ligand. Effectivement, les cellules endothéliales formant les sinusoides médullaires sont capables de capturer le CXCL12 circulant et de le transporter vers le parenchyme médullaire. Le gradient de CXCL12 ainsi formé vers la MO facilite la greffe de CSH circulantes et prévient l'échappement des CSH et progéniteurs situés dans la niche périvasculaire vers la circulation (Dar *et al.*, 2005). Cette fonction est la même que celle retrouvée dans le RCK atypique DARC (Hansell *et al.*, 2011) qui est capable de redistribuer les CKs environnantes pour conserver une concentration optimale au site d'action et prévenir l'internalisation des RCK induite par leur ligands.

3- CXCR7

A- Historique

RDC-1 a été initialement identifié comme un RCPG putatif pour le *Vasoactive intestinal peptide* (VIP) (Sreedharan *et al.*, 1991), propriété écartée ensuite (Cook *et al.*, 1992; Nagata *et al.*, 1992). En 2005, il a été identifié comme capable de fixer CXCL12 avec

une affinité 10 fois supérieure à celle de CXCR4 (Naumann *et al.*, 2010). Il fixe en outre CXCL11 et a été montré comme capable, à l'instar de CXCR4, de promouvoir l'entrée de certaines souches du VIH dans sa cellule cible (Shimizu *et al.*, 2000). Sa particularité vient du fait qu'il ne possède pas le motif canonique DRYLAIV de fixation des protéines G (Graham *et al.*, 2012) et est considéré comme incapable de promouvoir une signalisation dépendante des protéines G. Néanmoins, cette incapacité reste source de discussion (Levoye *et al.*, 2009; Odemis *et al.*, 2012). En revanche, il est largement admis que CXCR7 sert de récepteur destiné à capter le CXCL12 extracellulaire et à diminuer sa disponibilité pour CXCR4 (Hoffmann *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). A l'instar de *Cxcr4*, les souris invalidées pour *Cxcr7* présentent une létalité embryonnaire due à des malformations cardiaques, ce qui suggère un rôle différent mais complémentaire de CXCR4 (Gerrits *et al.*, 2008).

B- Expression tissulaire

CXCR7 a été identifié comme un corécepteur du VIH sur les LT (Shimizu *et al.*, 2000), il est en outre exprimé sur les LB, les neurones et certaines cellules tumorales (Sanchez-Martin *et al.*, 2013). Une particularité de ce RCK atypique est sa faible expression membranaire à la surface des cellules l'exprimant, ceci étant probablement dû à sa fonction qui est principalement d'effectuer des cycles entre la membrane et le cytosol. La fonction attribuée est la capture de ses ligands extracellulaires, la dégradation intracellulaire et la recapture de ceux-ci lors de son recyclage membranaire.

C- Régulation de l'expression et de l'activité

a- Transcription

Au niveau transcriptionnel, les ARNm codant pour CXCR7 se retrouvent dans de nombreux organes (<http://www.genecards.org/>). Cela indique un spectre d'expression transcriptionnel aussi large que CXCR4 et étaye le fait que CXCR4 et CXCR7 pourraient fonctionner de concert.

b- Découplage expression/fonction

CXCR7 est considéré comme n'activant pas la voie des protéines G ; une explication partielle viendrait du fait que CXCR7 ne présente pas de motif canonique de fixation des

protéines G DRYLAIV, mais une séquence légèrement différente : DRYLSIT (Asp/Arg/Tyr/Leu/Ser/Ile/Thr) (Sanchez-Martin *et al.*, 2013). Il semble en revanche signaler principalement par une voie dépendante des β -Arr (Mahabaleshwar *et al.*, 2012; Rajagopal *et al.*, 2010). On parle alors de récepteur biaisé.

c- Internalisation et recyclage

Contrairement à CXCR4, CXCR7 est capable de constitutivement effectuer des cycles d'expression membranaire, d'internalisation et de recyclage vers la membrane (Luker *et al.*, 2010; Mahabaleshwar *et al.*, 2012). De façon intéressante, la capacité de CXCR7 à s'hétéro-dimériser avec CXCR4 pourrait être un nouveau mode de régulation de CXCR4 soit en le forçant à internaliser, soit en le stabilisant à la membrane, modulant ainsi le signal transduit par CXCR4 (Decaillot *et al.*, 2011; Sanchez-Alcaniz *et al.*, 2011).

D- Modèles de signalisation

Peu de choses sont connues quant à la signalisation induite par CXCR7. La fixation des β -Arr a été montrée comme capable de promouvoir la signalisation *via* les *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Il est postulé que le processus d'hétéro-dimérisation pourrait être partiellement responsable de ceci dans certains tissus (Lipfert *et al.*, 2013). De même, dans les astrocytes, il a été montré une capacité à signaler *via* les protéines G (Odemis *et al.*, 2012). Le consensus adopté quant au rôle de CXCR7 est celui d'un RCK « leurre » uniquement destiné à diminuer la disponibilité de CXCL12 présenté à CXCR4 (**Figure 17**).

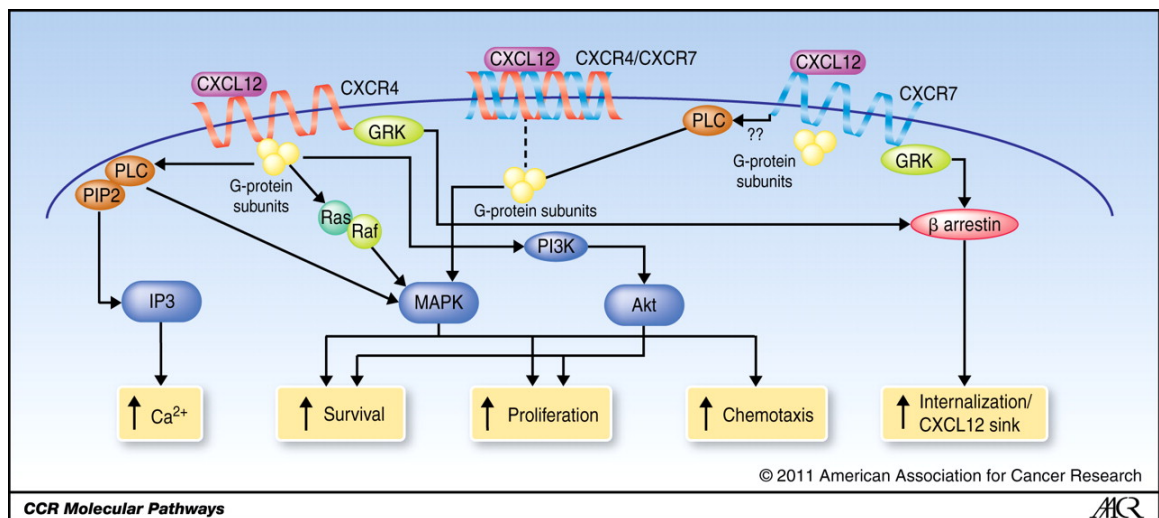


Figure 17 : Réponses cellulaires induites par CXCL12 via ses récepteurs (Duda *et al.*, 2011).

E- Fonctions cellulaires de CXCR7

a- Récepteur « leurre » de CXCL12

A ce jour, la fonction de captation de CXCL12 ne semble pas avoir de fonction biologique directe. Une observation importante vient du fait que sur des cellules invalidées pour *CXCR7*, l'expression membranaire de *CXCR4* est absente, bien que son ARNm soit détecté. L'excès non dégradé de CXCL12 favoriserait une internalisation de *CXCR4* dès sa présence membranaire (Sanchez-Alcaniz *et al.*, 2011).

b- Partenaire de CXCR4

Les souris invalidées pour *Cxcl12*, *Cxcr4* et *Cxcr7* présentent une létalité périnatale identique. De même, les souris spécifiquement invalidées pour *Cxcr7* sur les cellules endothéliales présentent le précédent phénotype (Yu *et al.*, 2011). En revanche, les souris n'exprimant pas *Cxcl11* ne présentent pas de phénotype particulier (Sierro *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent un fonctionnement concerté entre CXCL12, CXCR4 et CXCR7 au cours duquel la présence de CXCL11 est triviale dans la modulation du trio. Il est considéré que les fonctions possibles soient dépendantes de CXCR4 ou de l'hétérodimère CXCR4/CXCR7. Il n'est pas non plus exclu que les fonctions biologiques du dimère

putatif soient différentes de celles médiées par CXCR4 seul sur un type cellulaire considéré (Levoye *et al.*, 2009; Sierro *et al.*, 2007).

c- Prolifération et survie

L'implication de CXCR7 dans les processus cellulaires de prolifération et survie se concentre majoritairement dans les cas pathologiques. En effet, CXCR7 est exprimé dans de nombreux types de tumeurs et semble favoriser la croissance tumorale (Hattermann & Mentlein, 2013). Néanmoins, il est difficile d'affirmer son rôle au niveau cellulaire sans l'utilisation d'antagonistes spécifiques car son expression est concomitante à celle d'autres RCKs pour lesquels il partage un ou plusieurs ligands. Notamment, l'expression concomitante de CXCR4 est fréquente sur le tissu considéré et CXCR4 est connu pour favoriser seul ces processus cellulaires en conditions pathologiques (Balkwill, 2004).

d- Migration cellulaire

Il a été montré que CXCR7 est néanmoins capable de promouvoir un mouvement cellulaire sur les neurones, LB et cellules tumorales d'une façon identique à celle de CXCR4 sur une cellule cible (Hattermann & Mentlein, 2013; Liu *et al.*, 2013; Virgintino *et al.*, 2013). A l'instar de CXCR4, cette migration est médiée par les β -Arr et la phosphorylation de ERK (Lee *et al.*, 2013).

IV- L'axe de signalisation CXCL12-CXCR4 en physiologie

1- Hématopoïèse

A- Cellules souches hématopoïétiques

En considérant le lignage leucocytaire, les CSH se trouvent dans des niches spécifiques au sein de la MO. Il est actuellement accepté que ces niches soient formées de cellules stromales productrices de CXCL12. L'action de CXCL12 dans ces niches permet à la fois le maintien de l'hématopoïèse en régulant la balance entre prolifération et quiescence des CSH (Nie *et al.*, 2008), la rétention de celles-ci dans la MO (Ratajczak *et al.*, 2012) et le trafic entre les niches périvasculaires et endostéales nécessaires à une différenciation efficace des CSH en progéniteurs (Cheng & Qin, 2012; Ding & Morrison, 2013).

B- Lignage B

Initialement identifié comme facteur de prolifération des cellules PreB, CXCL12 joue avec CXCR4 un rôle crucial dans la production des LB immatures émigrant de la MO issus des PreB (Nie *et al.*, 2004) . Les cellules ProB nécessitent une coactivation par CXCR4 pour leur différenciation dans les phases de sélection afin de pouvoir se développer normalement (Nagasawa *et al.*, 1996b). De même, la régulation fine de CXCR4 est nécessaire pour que les cellules ProB et PreB ne quittent pas leurs niches de différenciation, mais la diminution membranaire de CXCR4 est nécessaire pour que les LB immatures puissent quitter la MO pour parachever leur différenciation périphérique (Honzarenko *et al.*, 1999).

C- Lignage T

Les ETP quittent la MO pour migrer vers le thymus où ils adoptent un phénotype DN. Les thymocytes DN vont nécessiter l'expression de CXCR4 afin de pouvoir se positionner correctement dans le thymus et d'être coactivés lors du point de passage de sélection β (Tramont *et al.*, 2010). L'absence de CXCR4 mène à une mortalité importante de ces cellules DN qui n'achèvent pas correctement leur différenciation. En revanche, il est nécessaire pour les LT DP de diminuer leur expression de CXCR4 au profit de CCR7 pour achever leur engagement vers un lignage SP qui nécessite un positionnement précis dans le thymus et permettre leur relargage en périphérie (Halkias *et al.*, 2013).

D- Lignage NK

La mise en évidence de l'importance de CXCR4 dans l'ontogénie des lymphocytes NK est récente et CXCR4 n'a été considéré que comme un facteur de rétention de ces cellules dans la MO, site de leur ontogénie (Bernardini *et al.*, 2008). L'administration d'un inhibiteur spécifique de CXCR4, l'AMD3100 (Plerixafor/Mozobil), connu pour ses propriétés mobilisatrices de CSH dans la circulation, a montré une augmentation de la population NK dans le sang. Il de même été montré, à l'instar des LB, que l'expression de Cxcr4 est sinusoïdale. En effet, les progéniteurs NK sont les cellules exprimant le plus Cxcr4. Cette expression est diminuée sur les NK immatures médullaires puis est augmentée sur les stades matures (Bernardini *et al.*, 2008). De façon analogue aux LB, la

réponse chimiotactique des NK à Cxcl12 n'est pas directement liée à l'expression de Cxcr4. En effet, les NK matures sont la population la plus sensible à l'action chimiotactique de Cxcr4, ce qui met en évidence son rôle rétenteur des NK dans la MO.

2- Différenciation périphérique des lymphocytes

A- Compartimentalisation lymphoïde

Les LB immatures et LT naïfs expriment CXCR4 dans la circulation sanguine (Bleul *et al.*, 1997; Vicente-Manzanares *et al.*, 1998). Le recrutement de ces cellules dans les OLS se fait via un système dépendant des CK. CXCR4 joue un rôle crucial pour le recrutement des LB, mais aussi dans leur rétention au sein de ces sites (Okada *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012). Il a de même été démontré, dans le CG, que l'expression de CXCR4 sur les LB de la ZS uniquement joue un rôle dans la compartimentalisation adéquate de ces LB (Allen *et al.*, 2004). Enfin, certaines populations de LB, les LB de la ZM de la rate montre une très importante influence vis-à-vis de l'axe de signalisation Cxcr4/Cxcl12 qui est indispensable au maintien de la structure de la ZM (Wang *et al.*, 2012).

B- Réponse immunitaire à médiation humorale

Les CDe activées se mettent à surexprimer Cxcr4 pour rejoindre les GL *via* les vaisseaux lymphatiques afférents pour pouvoir présenter à des LT naïfs les Ag apprêtés. A leur contact, les LT naïfs capables de reconnaître spécifiquement un complexe CMH-peptide *via* leur TCR vont s'activer en LT effecteur ou mémoire selon leur capacité à reconnaître l'Ag sous l'influence des cytokines secrétées par la DC (McColl, 2002).

Les CG sont des microstructures anatomiques qui se forment lorsque le SI met en place une réponse immunitaire adaptative. Ces CG font intervenir les CDe, les LT auxiliaires et les LB folliculaires, qui doivent rentrer en contact les uns avec les autres. Un LB immature se trouve initialement dans la ZS dans laquelle il va entrer dans une phase de prolifération intense et une phase de maturation d'affinité ; on parle alors de centroblaste, qui présente une surexpression membranaire de CXCR4. Lorsqu'il a suffisamment mûri, le centroblaste se différencie dans la ZC en centrocyte où il va alors effectuer une commutation isotypique et adopter un phénotype de LB mémoire ou PC. La mise en

place de cette structure complexe est dynamique et l'implication de CXCR4 dans le positionnement des centroblastes a été rapportée (Allen *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2009).

C- Maintien de la mémoire immunitaire spécifique

Les PC, LT effecteurs mémoires et centraux mémoires vont ensuite quitter le GL, ce qui va nécessiter de diminuer l'influence de CXCL12 en favorisant l'expression de récepteurs impliqués dans la sortie tels que les S1PR (Cyster, 2005; Mok *et al.*, 2012). Ces populations mémoires expriment CXCR4. En revanche, la délétion conditionnelle de *Cxcr4* sur les PC ne semble pas modifier leur tropisme médullaire. De même, les LT médullaires ne présentent pas de surexpression membranaire de *Cxcr4*. (Nie *et al.*, 2004; Tokoyoda *et al.*, 2009). Aussi, le rôle de *Cxcr4* dans le maintien de la mémoire immunitaire serait dû à des processus cellulaires impliquant la survie et la prolifération du compartiment mémoire (Becker *et al.*, 2005; Chu & Berek, 2013; Parretta *et al.*, 2005; Tokoyoda *et al.*, 2009).

V- L'axe de signalisation CXCR4-CXCL12 en pathologie

1- Infection par le virus de l'immunodéficience humaine

Le VIH est un lentivirus de la famille des *retroviridae* dont le mode de transmission est sexuel ou sanguin et son infection chronique mène au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). On dénombre près de 2 à 3 million de nouveaux infectés par an (Piot & Quinn, 2013). L'issue fatale et la prévalence importante de l'infection au VIH font de cette pandémie un des enjeux majeurs de santé publique. Les cellules cibles sont les cellules exprimant le récepteur cellulaire CD4 et un corécepteur nécessaire à son entrée. La première population cible est constituée des monocytes/macrophages qu'il infecte par un tropisme CCR5-dépendant, puis, lorsque la charge virale est suffisante, il adopte un tropisme CXCR4-dépendant où il va préférentiellement infecter les LT CD4⁺ (Verhofstede *et al.*, 2012). L'infection par ce virus favorise la lyse des LT CD4⁺, dont le nombre diminue drastiquement jusqu'au point où il est insuffisamment représenté (200/mm³). Dès lors, le SI n'est plus capable de prévenir l'apparition d'infections opportunistes (ex. cryptococcose, toxoplasmose) qui sont létales à terme (Alizon & Magnus, 2012).

Pour infecter une cellule cible, le virus doit fixer cette cellule, fusionner son enveloppe avec et libérer son contenu composé de matériel génétique (ARN), de protéines permettant la rétro-transcription de son génome et son intégration dans le génome de la cellule hôte. Pour se faire, l'enveloppe bilipidique du virus doit fusionner avec celle de sa cible et libérer dans le cytosol son contenu (Grove & Marsh, 2011). Le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe, la gp160, est clivé par une protéase trans-golgiennne de type *furin* pour donner deux produits : la gp120 extracellulaire et la gp41, transmembranaire. La gp120 a un tropisme important pour le récepteur cellulaire CD4. Lorsqu'elle le fixe, un changement conformationnel permet l'interaction avec un corécepteur CCR5 ou CXCR4. L'engagement de ce corécepteur permet le rapprochement des deux bicouches lipidiques (virus et hôte) et enfin la fusion de celles-ci. Une approche thérapeutique pour prévenir l'infection du VIH sur les monocytes et les LT CD4⁺ a été de masquer les corécepteurs. Le maraviroc, un inhibiteur de CCR5, a montré des résultats concluants pour prévenir l'infection sur les monocytes et est actuellement utilisé en clinique.

A ce jour, de nombreuses tentatives thérapeutiques de ciblage de CXCR4 pour limiter la dissémination virale au sein de l'hôte ont été effectuées (Szpakowska *et al.*, 2012), mais sans succès sur la cible initiale. En revanche, un composé a montré un effet inattendu. L'AMD3100, un dérivé du bicyclame, est un antagoniste orthostérique réversible et spécifique de CXCR4 (Este *et al.*, 1999).

Il a montré *in vitro* un succès à limiter la fusion de souches du VIH présentant un tropisme pour CXCR4, mais *in vivo* a eu des effets secondaires importants tels que la libération de CSH en périphérie et une toxicité notable pour le cœur (soulevée par l'*European Medicines Agency* lors de l'évaluation de ce médicament (Source : EMEA ; Procedure No. EMEA/H/C/001030)). Désormais, il est nécessaire de produire des inhibiteurs spécifiques de CXCR4 sur les sites de liaison de la gp120 à CXCR4 et de déterminer un modèle prédictif des effets secondaires pour valider les candidats éventuels.

2- Développement du Lupus Erythémateux Disséminé

Le Lupus Erythémateux Disséminé (LED) est une maladie auto-immune chronique à l'évaluation clinique hétérogène et dont les dysfonctions immunitaires sont variées

(Rahman & Isenberg, 2008). Les facteurs génétiques et le paramètre hormonal prédisposent pour le développement du LED, touchant principalement les femmes méditerranéennes (Deng & Tsao, 2010). Cette maladie complexe, qui affecte plusieurs organes, est un facteur de risque pour les parturientes (Chen *et al.*, 2010) et pouvant mener à la mort, notamment lorsque les dommages néphrétiques sont sévères. Le LED est caractérisé par une réponse humorale intense et de nombreuses altérations du lignage des LB, telles que l'hyperréactivité lymphocytaire et une production d'auto-Ac dirigés contre les composants du soi (Anti-ADN, Anti-Ribonucléoprotéines) (Nashi *et al.*, 2010). Ces Ac dirigés contre les composants nucléaires ont la capacité de s'agglomérer et de former des complexes immuns qui détruisent les tissus où ils s'agrègent, tels que le rein, les vaisseaux sanguins, et leur contribution a été suggérée dans les manifestations neurologiques (Deshmukh *et al.*, 2006; Diamond & Volpe, 2012; Rekvig *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013).

De nombreuses perturbations du compartiment des LB, tels que l'augmentation des PC, les dépôts de complexes immuns et l'activation de la voie du complément, soulignent le rôle critique des LB dans la pathogénie du LED. Corroborant ceci, deux thérapeutiques basées sur les Ac monoclonaux dirigés contre CD20 et CD22 ont montré des résultats encourageants et appuient démontrent le rôle central des LB dans le LED (Daridon *et al.*, 2010; Pisetsky *et al.*, 2011). CXCR4 exerce un rôle critique dans la biologie des LB, et a été montré comme surexprimé dans différents modèles murins de LED. En revanche, des rapports conflictuels se trouvent chez l'humain. L'augmentation de ce RCK a été retrouvée dans les LB circulants (Wang *et al.*, 2010), mais nous avons mis en évidence une diminution dans une cohorte spécifique des récepteurs de la CK CXCL12, à savoir CXCR4 et CXCR7 (Biajoux *et al.*, 2012). Il est néanmoins certain qu'il existe une dérégulation de CXCR4 modulant la production ou le maintien des auto-Ac, tant au niveau local que systémique (Chong & Mohan, 2009).

3- Implication dans le cancer épithélial de l'ovaire

Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est une des maladies au plus fort taux de mortalité des pathologies malignes gynécologiques. Il est le sixième cancer le plus commun et la cinquième cause de mortalité liée au cancer chez les femmes dans les pays développés

(Hunn & Rodriguez, 2012). Ce type de cancer se développe de façon asymptomatique dans ses phases précoces ; au moment du diagnostic, les femmes présentant un CEO ont une maladie disséminée (expansion péritonéale et métastases dans l'omentum) et à un stade avancé. Dès lors, l'espérance de vie à 5 ans est inférieure à 30%. Malgré la forte incidence et mortalité, l'étiologie du CEO et les mécanismes moléculaires de son développement restent obscurs. Seuls les paramètres d'évaluation clinique, histologiques et post-interventionnels sont les facteurs pronostiques, soulignant clairement un manque de biomarqueurs de la pathologie. Les CKs et RCKs sont connus comme des éléments régulant le développement des tumeurs épithéliales primaires (Barbieri *et al.*, 2010). Leur rôle dans les processus cellulaires, la modulation de la réponse immunitaire et la communication avec le microenvironnement tumoral sont les trois mécanismes impliqués dans le développement de ce type de tumeurs.

CXCL12 est constitutivement exprimé dans l'épithélium sain d'ovaire et les trompes de Fallope, qui sont des sources probables de CEO (Machelon *et al.*, 2011). Bien que cette expression ne soit pas corrélée avec la survie des patients, il reste néanmoins possible que l'action médiée par CXCL12 dans les tissus sains ne soit pas la même que dans les tissus transformés, notamment *via* une action autocrine/paracrine. De plus, le rétrocontrôle positif entre CXCR4 et VEGFR1 *via* HIF-1a et HIF-2 suggère que le potentiel disséminatoire est augmenté *via* une altération de la transduction du signal médié par CXCR4 au profit de VEGFR1 (Kryczek *et al.*, 2005). Cette suggestion semble supportée par le fait que dans un modèle de xénogreffe de CEO, l'inhibition de l'axe CXCR4/CXCL12 seul semble limiter le processus disséminatoire des tumeurs (Righi *et al.*, 2011).

In vitro, la transfection stable pour un ARNi dirigé contre CXCL12 sur une lignée de cellules (BR-5) du CEO, qui exprime constitutivement CXCL12 et CXCR4, réduit la prolifération cellulaire. Cela démontre que la production de CXCL12 par ces cellules régule de façon autocrine la prolifération cellulaire. *In vivo*, la xénogreffe de ces cellules dans un modèle immunocompétent FVB/NJ montre une diminution de la prise de masse tumorale, de la dissémination intrapéritonéale et une augmentation de l'infiltrat de LT régulateurs lorsqu'elle est comparée aux cellules BR-5 contrôles. Le rôle de CXCR4 est

corroboré par le fait que le traitement par AMD3100 présente les mêmes résultats *in vivo*. Le rôle de CXCR4 est à la fois direct et indirect, jouant sur la capacité angiogénique tumorale, sa survie et la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale (Righi *et al.*, 2011). Une question reste néanmoins en suspens : la contribution du second récepteur pour CXCL12, CXCR7 n'a pas été étudiée et son rôle, ayant été démontré dans de nombreux types de cancers (Sanchez-Martin *et al.*, 2013), pourrait être un biomarqueur intéressant.

VI- Rôle étiologique de CXCR4 dans le Syndrome WHIM

1- Physiopathologie

Le syndrome WHIM (SW) est un déficit immuno-hématologique congénital rare dont la prévalence estimée est de 0,23 par million de naissances (Beaussant Cohen *et al.*, 2012). L'acronyme WHIM est tiré de l'évaluation clinique de cette pathologie. Les patients présentent :

- Des verrues (Warts) cutanées et condylomes ano-génitaux dysplasiques liées à une susceptibilité accrue au virus du papillome humain (VPH).
- Une hypogammaglobulinémie (H), un paramètre néanmoins sujet à des observations non consensuelles (Dotta *et al.*, 2011).
- Une susceptibilité accrue aux infections (I) bactériennes du tract respiratoire par des bactéries encapsulées.
- Une myelokathexie (M), qui est le signe pathognomonique de la pathologie, correspondant à une morphologie particulière des PNN et éosinophiles dans la MO qui présentent des noyaux pyknotiques et un profil apoptotique. Le nom de myélokathexie a été donné car cette observation, bien que non démontrée formellement, a été supposée comme étant une conséquence d'une rétention accrue des polynucléaires dans la MO (Zuelzer, 1964).

2- Altération lymphoïde

Les patients présentent une leucopénie qui touche tout les types leucocytaires (Dotta *et al.*, 2011) et notamment les lymphocytes, qu'ils soient T, B ou NK. De façon surprenante, la lympho-neutropénie, inévitablement retrouvée chez les patients, ne semble pas générer

les complications « classiques » des autres neutropénies congénitales. En effet, sous l'action d'un stress infectieux, de l'administration de G-CSF ou d'AMD3100, les patients présentent une hyperleucocytose et sont capables de résoudre le processus infectieux (Badolato, 2013; Dale *et al.*, 2011; McDermott *et al.*, 2011). Cela suggère un défaut de compartimentalisation plutôt qu'un défaut de production. Des analyses immunophénotypiques ont révélé une diminution du nombre de LB mémoires et de LT naïfs et centraux/mémoires, contrastant avec l'accumulation de LT effecteurs/mémoires présentant un répertoire du TCR (Gulino *et al.*, 2004) et BCR restreint (Mc Guire *et al.*, 2010), suggérant une capacité diminuée à produire un répertoire B et T fonctionnel, bien que capable néanmoins de produire une réponse immunitaire spécifique (Handisurya *et al.*, 2010).

3- Hétérogénéité des patients

Le rôle central de CXCR4 a été mis en évidence à la fois dans des processus physiologiques et pathologiques (**Figure 18**). En revanche, il n'a jamais été identifié comme étiopathogène d'une maladie. Le SW est une maladie prototypique induite par des dérégulations d'un RCK. En effet, les bases moléculaires et génétiques du SW sont hétérogènes, mais impliquent spécifiquement le RCK CXCR4 ou ses partenaires intracellulaires. La plus grande part des patients présentent des mutations hétérozygotes tronquant le domaine C-terminal du RCK CXCR4 (Dotta *et al.*, 2011). Il existe néanmoins d'autres types de mutations retrouvées dans le SW impliquant des modifications du C-terminal, à savoir des décalages du cadre de lecture ou des mutations ponctuelles d'un AA menant à une modification de la polarité du C-terminal (Liu *et al.*, 2012). Toutes ces mutations invalident des sites de phosphorylation de type Ser ou Thr qui se trouvent en C-terminal et décrits comme des cibles de GRKs. Ces invalidations perturbent le recrutement des β -Arr dont la surexpression n'est pas corrective du défaut d'internalisation (Lagane *et al.*, 2008). En revanche, il a été montré dans ces conditions que les β -Arr sont capables de fixer un motif SHSK dans la 3^{ème} BIC et sont capables en retour de promouvoir une signalisation ERK maintenue dans le temps.

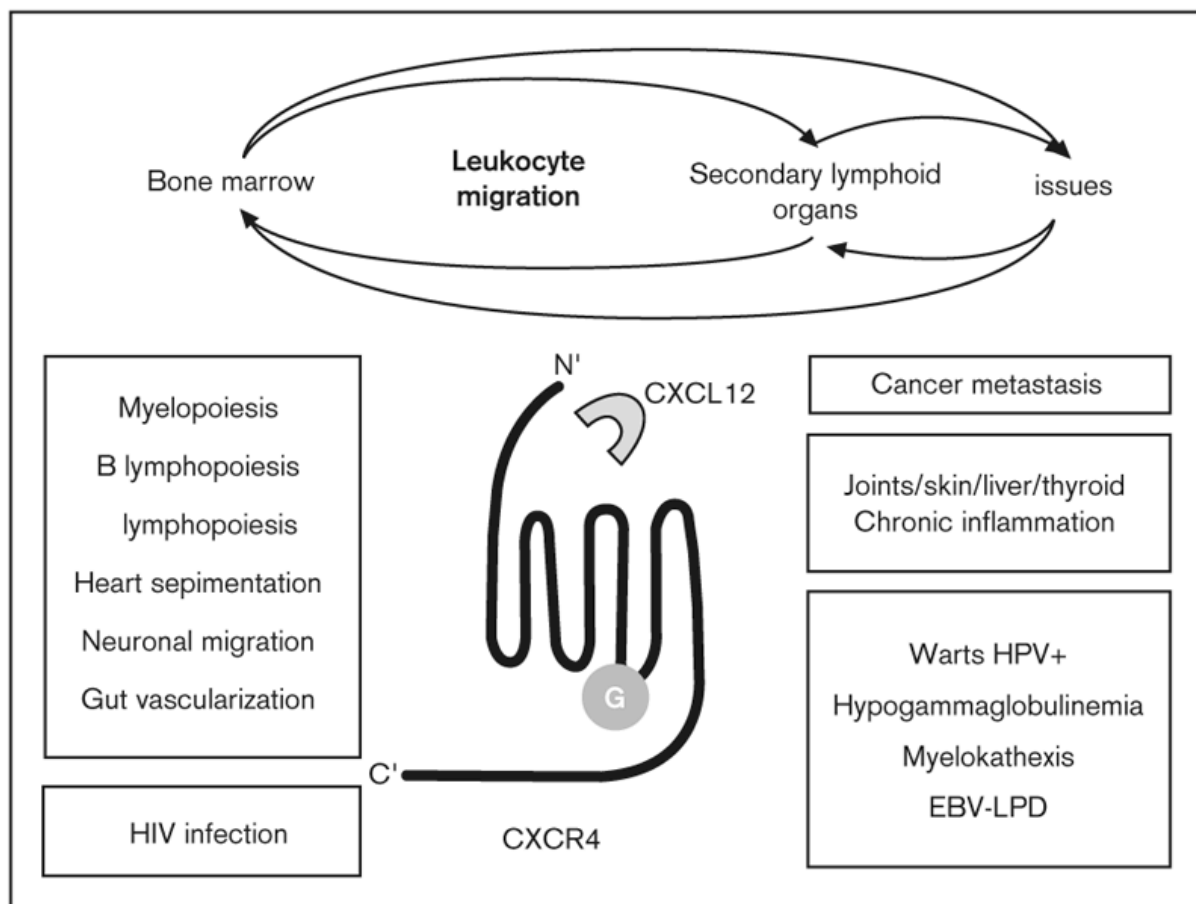


Figure 18 : Vue schématique des fonctions de CXCR4 (Gulino, 2003).

Un second type de patient, plus rare, ne présente pas de modification du domaine C-terminal de CXCR4 mais une altération d'un de ses partenaires intracellulaires, à savoir la GRK-3 (Balabanian *et al.*, 2008). En effet, l'inactivation de la *GRK-3* dans des cellules de témoins par ARNi induit un défaut d'inactivation de CXCR4 tandis que la surexpression dans des cellules de patients ne présentant pas de mutations du domaine C-terminal corrige ce défaut. Ces résultats indiquent donc une spécialisation de la GRK-3 dans le processus de désensibilisation de CXCR4.

Dans toutes les formes du SW, les leucocytes de patients présentent une hyperactivation de l'axe de signalisation médié par CXCR4 en réponse à CXCL12. En effet, ces patients présentent un défaut de désensibilisation et d'internalisation du RCK menant à un gain de fonction du RCK (**Figure 19**).

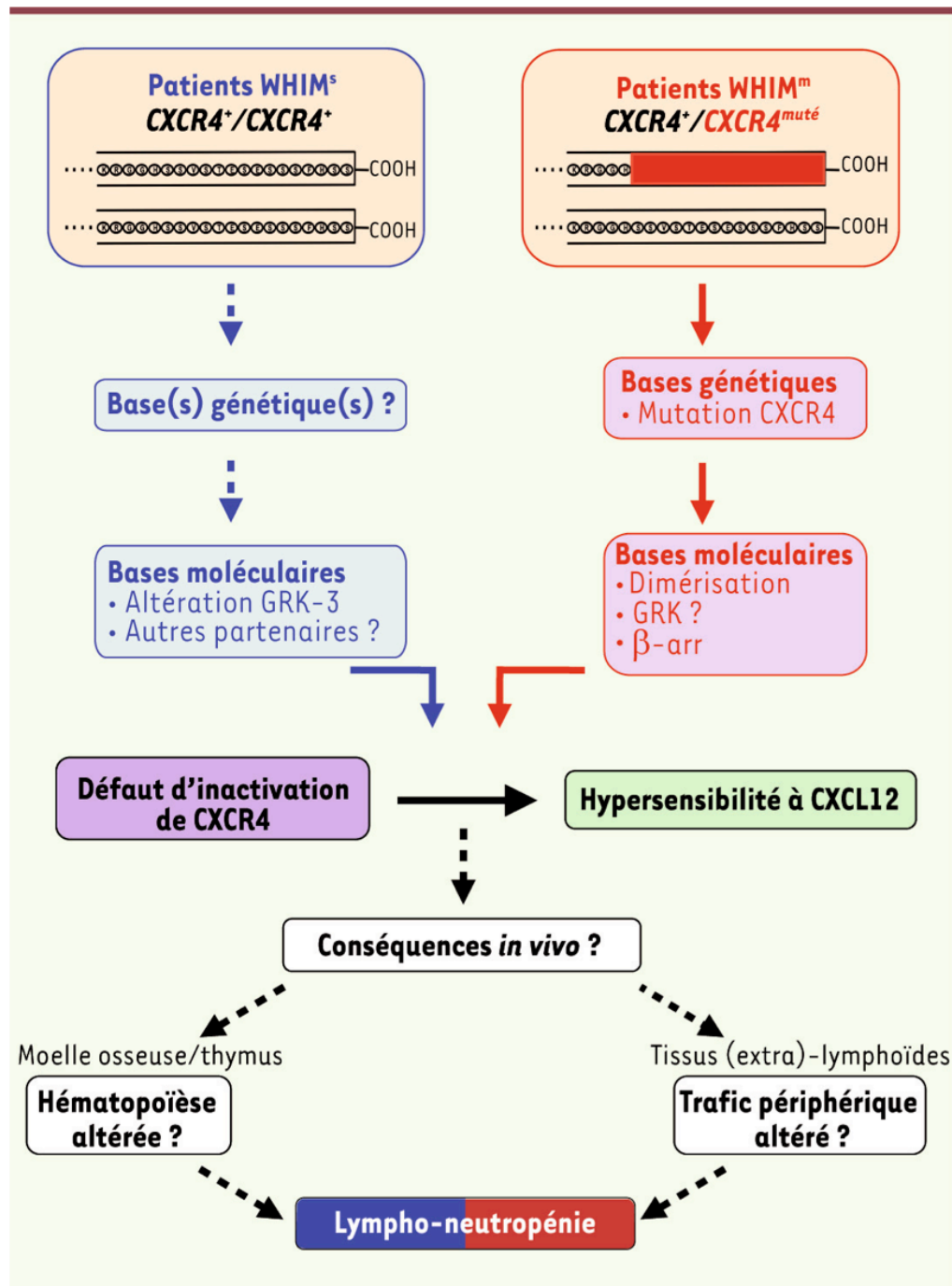


Figure 19 : Mécanisme et impact sur l'homéostasie leucocytaire du gain de fonction de CXCR4 dans le SW. Ce schéma rapporte les avancées récentes dans la compréhension des bases moléculaires du gain de fonction de CXCR4 et indique les étapes clés à caractériser afin d'élucider la physiopathologie du SW (Bignon *et al.*, 2011).

4- Impasse thérapeutique

Le traitement de ces patients est encore peu spécifique et est principalement constitué d'injections intraveineuses d'Ig, d'antibiotiques et de G-CSF. Les verrues subissent quant à elles un traitement chirurgical.

Récemment, l'utilisation d'AM3100, un inhibiteur de CXCR4 utilisé pour la mobilisation des CSH, a été testée chez certains patients (Dale *et al.*, 2011; McDermott *et al.*, 2011). Néanmoins, il n'existe à ce jour pas de traitement spécifique de cette pathologie, et le besoin de produire et de caractériser un modèle préclinique d'hyperactivation de CXCR4 est crucial pour déterminer précisément les altérations et la fonctionnalité d'un système constitutivement biaisé.

Objectifs et Résultats

« Ce n'est pas assez d'avoir l'esprit bon, mais le principal est de l'appliquer bien. »

René Descartes

(Discours de la Méthode, 1637)

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le SW fait partie des neutropénies congénitales rares pour lesquelles les mécanismes cellulaires impliqués sont toujours inconnus. Dès 2003, le lien génétique avec des mutations hétérozygotes du gène codant pour *CXCR4* a été mis en évidence (Hernandez *et al.*, 2003). Depuis, les divers cas de SW ont toujours été reliés à des anomalies de séquence de *CXCR4* (Dotta *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) ou de ses partenaires intracellulaires (Balabanian *et al.*, 2005b). Dans tous les cas, les patients présentent une lympho-neutropénie sévère et leurs leucocytes montrent un gain de fonction de *CXCR4* en réponse à *CXCL12*. La compréhension des dérégulations de l'homéostasie leucocytaire par le gain de fonction de *Cxcr4* est un prérequis indispensable pour envisager le développement de traitements spécifiques de cette pathologie.

La recherche de ces mécanismes de perturbation du SI dans ce contexte se heurte à un frein méthodologique majeur. Les modèles d'inactivation systémique ou conditionnelle de *Cxcr4* sont inappropriés du fait même que *Cxcr4* est à la fois présent et hyperactif. Les seules informations de ces modèles ne permettraient que de suspecter des points de contrôle (*checkpoints*) où *Cxcr4* serait indispensable au développement leucocytaire.

Les outils qui existaient alors étaient des lignées cellulaires transduites ou un modèle de poisson-zèbre (Hickstein & West, 2010). Si le poisson-zèbre est un outil approprié dans l'étude des processus immunitaires innés, comparativement à l'humain, il existe des différences plus importantes dans le développement de cet animal que dans celui de la souris, notamment dans la formation du système lymphatique (Koltowska *et al.*, 2013).

Un modèle animal adéquat est donc requis pour déterminer les conséquences *in vivo* de l'hyperactivité de *CXCR4* dans les processus menant à la lymphopénie chez les patients.

Compte tenu de la proximité génétique et structurelle entre *CXCL12* (98% d'identité), *CXCR4* (100% d'identité pour le domaine C-terminal) et la conservation de l'axe de signalisation *CXCL12/CXCR4* entre l'humain et la souris, l'utilisation d'un modèle murin est le plus approprié. En outre, le caractère non létal de mutation localisée dans

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

CXCR4, combiné à sa pénétrance complète chez l'homme, rendent possible l'exploration du trait hétérozygote de l'anomalie de ce RCK chez la souris.

La production d'un modèle murin hétérozygote pour la mutation humaine tronquant *CXCR4*¹⁰¹³ rapportée chez des patients (Balabanian *et al.*, 2005b) a été permis par la mutagenèse dirigée de *Cxcr4* et son introduction dans la souris par recombinaison homologue (*knock-in*).

L'objectif général de ce travail a été de déterminer par quels mécanismes le défaut de désensibilisation de *Cxcr4* génère une lympho-neutropénie. En effet, le modèle murin d'hyperactivation de *Cxcr4* permet d'évaluer *in vivo* l'impact du gain de fonction de *Cxcr4* sur l'homéostasie leucocytaire et de démontrer formellement l'effet trans-dominant de l'allèle *Cxcr4*¹⁰¹³ sur l'allèle sauvage.

L'hypothèse de travail est que la leucopénie résulte d'un défaut de l'hématopoïèse ou une altération de la domiciliation périphérique des leucocytes.

De plus, la littérature rapporte des altérations de la capacité des patients à produire (Mc Guire *et al.*, 2010) et maintenir (Handisurya *et al.*, 2010) une réponse immunitaire efficace. L'utilisation d'un modèle murin permettra en outre d'évaluer l'effet de la désensibilisation de *Cxcr4* sur la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

Ces avancées dans la compréhension du fonctionnement de *Cxcr4* dans les processus immunitaires ont pour perspective le développement de thérapies spécifiques de l'axe de signalisation du couple *Cxcl12-Cxcr4*. En utilisant le modèle préclinique murin, il est attendu de déterminer précisément les étapes de dysfonctionnement de l'ontogénie leucocytaire, de cribler les molécules capables de les corriger et d'étendre leur utilisation à d'autres pathologies impliquant cet axe de signalisation.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

RESULTATS

I- Les souris $Cxcr4^{+/1013}$, un modèle leucopénique du Syndrome WHIM

1- Rationnel

Cette étude a pour but de décrire le modèle murin présentant la mutation hétérozygote $Cxcr4^{1013}$ produit par l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch). Pour cela, nous avons vérifié l'absence de défauts développementaux chez cette souris. En effet, le rapport d'un cas de tétralogie de Fallot (Beaussant Cohen *et al.*, 2012) laissait entrevoir la possibilité d'une malformation cardiaque à l'instar des souris invalidées (Nagasawa *et al.*, 1996a; Tachibana *et al.*, 1998). Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'introduction de la mutation $Cxcr4^{1013}$ sur les lymphocytes de souris altérait l'expression membranaire de Cxcr4 par cytométrie en flux et si, à l'instar des patients (Balabanian *et al.*, 2005b), ne générerait pas d'accumulation membranaire du RCK à la surface cellulaire. Dans la même optique, nous avons vérifié si le gain de fonction était conservé par des tests de chimiotaxie en chambre de Transwell et tests d'internalisations. Les caractéristiques cellulaires obtenues, nous avons cherché à retrouver les caractéristiques sémiologiques du SW. Pour cela, nous avons déterminé le contenu leucocytaire sanguin et analysé le contenu sérique pour les Ig afin de déterminer la présence de la lympho-neutropénie et si la souris présentait une hypogammaglobulinémie. La souris ne possédant pas de virus de type VPH, le critère d'apparition des verrues n'a pu être évalué. Nous avons ensuite exploré par cytométrie en flux les OLP dans l'optique de mettre en évidence la myélokathexie et d'observer la différenciation lymphocytaire dans ces organes, une information encore non connue chez les patients. L'utilisation de ce modèle nous a de même permis d'étudier quantitativement les compartiments lymphocytaires dans le péritoine, la rate et les GLs, de même que, par immunohistochimie, l'architecture thymique, splénique, ganglionnaire et des PP, encore inexplorés chez les patients. Enfin, la validation de l'étiologie de la lympho-neutropénie a été effectuée par l'utilisation

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

d'antagonistes de CXCR4, l'AMD3100, ou de CXCL12, la Chalcone-4, sur la numération leucocytaire des souris sauvages et hétérozygotes.

2- Exposé des travaux

Article n°1 : « Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice » (Blood, 2012)

Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice

Karl Balabanian,¹ *Emilie Brotin,¹⁻³ *Vincent Bijaoux,¹ *Laurence Bouchet-Delbos,^{1,4} Elodie Lainey,⁵ Odile Fenneteau,⁵ Dominique Bonnet,⁶ Laurence Fiette,⁷ Dominique Emilie,^{1,8} and Françoise Bachelier¹⁻³

¹Inserm Unité Mixte de Recherche (UMR) S996, Université Paris-Sud, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics, Clamart, France; ²Inserm U819, Paris, France; ³Laboratoire de Pathogénie Virale, Institut Pasteur, Paris, France; ⁴Plateforme d'Immunomonitorage, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Clamart, France; ⁵Laboratoire d'Hématologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Robert Debré, Paris, France; ⁶Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR 7200, Centre National de la Recherche Scientifique/Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France; ⁷Histopathologie Humaine et Modèles Animaux, Institut Pasteur, Paris, France; and ⁸Service de Microbiologie-Immunologie Biologique, AP-HP, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France

Desensitization controls G protein-dependent signaling of chemokine receptors. We investigate the physiologic implication of this process for CXCR4 in a mouse model harboring a heterozygous mutation of the *Cxcr4* gene, which engenders a desensitization-resistant receptor. Such anomaly is linked to the warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome, a human rare combined immunodeficiency. *Cxcr4*^{+/mutant(1013)} mice display leukocytes with enhanced responses to Cxcl12 and

exhibit leukopenia as reported in patients. Treatment with CXCL12/CXCR4 antagonists transiently reverses blood anomalies, further demonstrating the causal role of the mutant receptor in the leukopenia. Strikingly, neutropenia occurs in a context of normal bone marrow architecture and granulocyte lineage maturation, indicating a minor role for *Cxcr4*-dependent signaling in those processes. In contrast, *Cxcr4*^{+/1013} mice show defective thymopoiesis and B-cell development, accounting for circulating lym-

phopenia. Concomitantly, mature T and B cells are abnormally compartmentalized in the periphery, with a reduction of primary follicles in the spleen and their absence in lymph nodes mirrored by an unfurling of the T-cell zone. These mice provide a model to decipher the role of CXCR4 desensitization in the homeostasis of B and T cells and to investigate which manifestations of patients with WHIM syndrome may be overcome by dampening the gain of CXCR4 function. (Blood. 2012;119(24):5722-5730)

Introduction

The WHIM syndrome (WS) is a rare combined immunodeficiency disorder characterized by human papilloma virus-induced warts, hypogammaglobulinemia, recurrent infections, and myelokathexis, an abnormal retention of hypermature neutrophils in the bone marrow (BM).¹ The clinical manifestations of this life-threatening disorder are however variable, except for neutropenia and lymphopenia that affects circulating B and T cells. WS patients are thus susceptible to respiratory infections caused by encapsulated bacteria, resulting in transient normalization of peripheral leukocyte counts.² This feature distinguishes WS from other congenital neutropenia, suggesting that the WS-related neutropenia arises from disturbed neutrophil trafficking rather than from a production defect. However, the mechanisms accounting for the lymphopenia are still lacking.

Research into the genetic basis for WS has identified inherited heterozygous autosomal dominant mutations in the *CXCR4* gene encoding for the receptor of the CXC α -chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12).³ CXCR4 engagement by CXCL12 induces typical activation of G α_i protein-dependent pathways of a chemokine receptor. These processes are regulated in a timely manner by the recruitment of β -arrestin to the receptor that precludes further G protein activation (ie, desensitization) and

leads to receptor internalization. Mutants of CXCR4 associated with WS give rise to impaired desensitization and internalization of the receptor on CXCL12 exposure, leading to enhanced and prolonged G protein- and β -arrestin-dependent responses.³⁻⁸ We reported a similar pattern of aberrant CXCL12/CXCR4 responses in leukocytes from the minority of patients, who carry a wild-type (WT) *CXCR4*.^{4,9} Consistent with a role for impaired CXCR4 desensitization in the WS pathophysiology. In cooperation with other chemokine receptors, *Cxcr4* in mice regulates physiologic processes involved in leukocyte homeostasis, and particularly hematopoiesis,¹⁰⁻¹² and the lymphoid and peripheral trafficking of neutrophil and lymphocyte subsets. Targeted disruption of either *Cxcl12* or *Cxcr4* is embryo lethal, evidencing critical functions for this couple in early development.¹³⁻¹⁵

Here, we have generated a new knockin mouse strain that harbors a WS-associated heterozygous mutation of the *Cxcr4* gene (ie, *Cxcr4*^{+/1013})⁴ to analyze the impact of *Cxcr4* desensitization on leukocyte homeostasis. We demonstrated that impaired *Cxcr4* desensitization leads to a gain of receptor function and engenders peripheral leukopenia that was transiently reversed by a treatment with the CXCR4 antagonist AMD3100. These findings indicated that mutant mice exhibit striking parallels to the major immunologic

Submitted January 9, 2012; accepted February 25, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, March 20, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-01-403378.

*E.B., V.B., and L.B.-D. contributed equally to this work.

The online version of the article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

features of WS. We highlighted that circulating lymphopenia results from defective thymopoiesis and B-cell development. Importantly, proper *Cxcr4*-dependent signaling is required for the formation of primary follicles in the spleen and lymph nodes (LNs). However, and in contrast to patients, circulating neutropenia occurred in a context of normal BM architecture. Moreover, mutant mice displayed normal granulocyte lineage maturation, revealing an unanticipated minor role for *Cxcr4*-dependent signaling in those processes. These data provide insight into the underlying mechanisms by which impaired *Cxcr4* desensitization affects leukocyte development, compartmentalization and likely function. They demonstrate the validity of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice as a model for WS-related immunohematologic manifestations to assess the potential of proposed treatments on a long term as well to develop new and chronic effective interventions.

Methods

Generation of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice

Mice were generated using a knockin strategy and bred under specific pathogen-free conditions as indicated in supplemental Methods and supplemental Figure 1 (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). The Institutional Animal Care and Use Committee d'Ile de France–Service Protection et Santé Animale approved this study.

Reagents, cell culture, and transfection

Dr F. Baleux (Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris, France) provided CXCL12. Recombinant mouse Ccl21/6Ckine, Cxcl13/Blc/Bca-1, and Ccl25/TECK were obtained from R&D Systems. AMD3100 (or plerixafor) was from Sigma-Aldrich. Chalcone 4 was prepared as described in Gasparik et al¹⁶ and in supplemental Methods. Descriptions of the culture and transfection are provided in supplemental Methods.

Flow cytometry analyses and antibodies

Analyses were carried out on an FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) as indicated in supplemental Methods using the following anti-mouse monoclonal antibodies (mAbs): CD3 (clone 145-2C11, hamster IgG1), CD4 (clone RM4-5, rat IgG2a), CD8 (clone 53-6.7, rat IgG2a), CD62L (clone MEL-14, rat IgG2a), CD44 (clone IM7, rat IgG2b), Gr1 (clone RB6-8C5, rat IgG2b), CD11b (clone M1/70, rat IgG2b), CD19 (clone 1D3, rat IgG2a), CD45R/B220 (clone RA3-6B2, rat IgG2a), CD21/C35 (clone 7G6, rat IgG2b), CD23 (clone B3B4, rat IgG2a), CD5 (clone 53-7.3, rat IgG2a), IgM (clone II/41, rat IgG2a), Cxcr2 (clone 242216, rat IgG2a), Cxcr4 (clone 2B11, rat IgG2b), Cxcr5 (clone 2G8, rat IgG2a), Ccr7 (clone 4B12, rat IgG2a), and Ccr9 (clone 242503, rat IgG2b). mAbs were conjugated to fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, allophycocyanin, or peridinin-chlorophyll proteins and were purchased from BD Biosciences, R&D Systems, or eBioscience.

Functional assays

Chemotaxis, receptor internalization, and apoptosis were performed as described previously¹⁷ and in supplemental Methods.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Total levels of IgG, IgM, and IgA were determined by ELISA, as described previously,¹⁷ with some modifications specified in supplemental Methods.

Histologic analyses

Detailed methods of organs fixation, immunohistochemistry, and immunofluorescence are described in supplemental Methods.

Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation and Western blot assays were performed according to Lagane et al,⁷ with modifications specified in supplemental Methods.

In vivo mobilization

Mice were treated with AMD3100 (5 mg/kg), chalcone 4 (12.4 mg/kg), or PBS via intraperitoneal injection. Blood and BM leukocytes were harvested and analyzed by flow cytometry as described in supplemental Methods.

Statistical analysis

Data are expressed as means ± SD. The statistical significance between groups was evaluated using the 2-tailed Student *t* test.

Results

Cxcr4^{+/¹⁰¹³} leukocytes exhibit a gain of *Cxcr4* function

To assess the in vivo consequences of the gain of CXCR4 function on leukocyte homeostasis, we engineered heterozygous *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice using a gene knockin strategy by replacing the mouse WT *Cxcr4* gene by a mutated gene reproducing the *CXCR4*¹⁰¹³ mutation we described in WS patients⁴ (supplemental Figure 1A). *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice were fertile, and births followed an expected Mendelian ratio. Young mice from both sexes developed without apparent morphologic abnormality. Genetic uniformity was reached by a 10-generation backcross to the C57BL/6/J background (> 98%). Genotyping and expression analyses of the *Cxcr4* receptor permitted to distinguish heterozygous (*Cxcr4*^{+/¹⁰¹³}) animals from their WT (*Cxcr4*^{+/+}) littermates (supplemental Figure 1B-D).

Circulating leukocytes from WS patients display normal expression of CXCR4 but enhanced migratory responses to CXCL12.⁴ Membrane expression levels of *Cxcr4* and other chemokine receptors, including *Ccr7*, *Cxcr2*, and *Cxcr5*, were in the same range between *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} and WT neutrophils, and lymphocytes from blood and lymphoid tissues (Figure 1A). Moreover, all tested leukocyte subsets from *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice, as shown for blood T and B cells, double-positive (CD4⁺CD8⁺), and single-positive (CD4⁺CD8⁻) thymocytes, displayed increased sensitivity to Cxcl12-promoted chemotaxis (Figure 1B). The maximal effective concentration of the chemokine decreased in *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} cells, indicating higher potency of Cxcl12 toward these cells. The increased responsiveness of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} thymocytes to Cxcl12 was abolished by the specific *Cxcr4* antagonist AMD3100 (Figure 1B) and was associated with impaired *Cxcr4* internalization following Cxcl12 stimulation (Figure 1C). In contrast, other chemokine receptors remained fully sensitive to their cognate ligand (Figure 1B-C). These data indicate that the gain of *Cxcr4* function affects neither the expression nor the function of these receptors, at least ex vivo, thus extending observations made in patient-derived cells.^{4,5,9}

Distal truncations of the WS-associated receptor remove the last 10 to 19 residues of the carboxyl-terminal tail (C-tail), including phospho-acceptor serine/threonine sites, that account for the failure of CXCR4 to be desensitized and internalized¹⁸ and contribute, together with abnormal β -arrestin-dependent signaling, to enhanced CXCL12-promoted chemotaxis.^{7,8} However, the complete deletion of the *Cxcr4* C-tail leads to a loss of G protein-dependent function that causes developmental defects similar to those of *Cxcr4*-null mice.¹⁹ This suggests that the remaining residues in the C-tail of WS-associated CXCR4 mutants that are targeted by numerous regulators^{8,9,18} contribute to the enhanced CXCL12-dependent signaling. In lysates from WT mice, *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice,

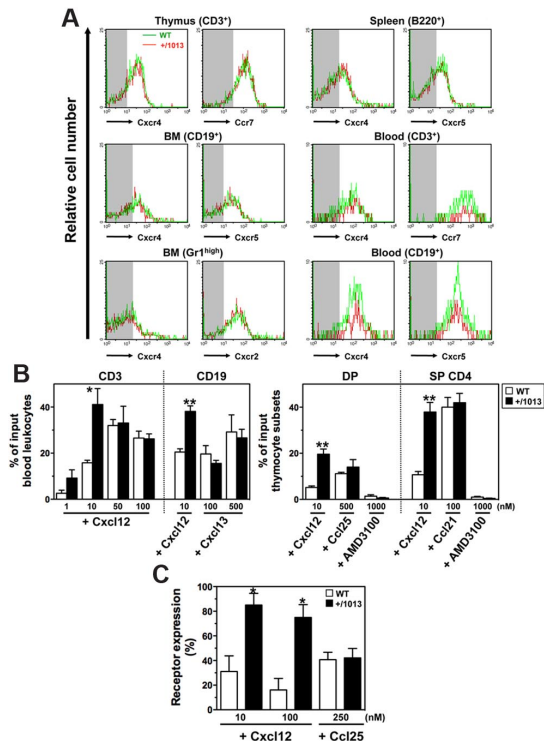


Figure 1. Exacerbated Cxcl12-induced chemotaxis of *Cxcr4*^{+/-1013} leukocytes. (A) Cxc and Cc receptors expression on gated thymocytes (CD3⁺), BM B cells (CD19⁺) and neutrophils (SSC^{high}Gr1^{high}), spleen B cells (B220⁺), and blood T (CD3⁺) and B (CD19⁺) cells from WT and *Cxcr4*^{+/-1013} (+/1013) mice. Background fluorescence is shown (shaded area). (B) Migration of blood T and B cells (left) and of double-positive (DP) and single-positive (SP) CD4⁺ thymocytes (right) in response to Cxcl12 (with or without AMD3100), Cxcl13, Ccl21, or Ccl25. (C) Cell surface expression of Cxcr4 and Ccr9 in DP thymocytes on exposure to Cxcl12 and Ccl25, respectively. Receptor expression on thymocytes incubated in medium alone was set as 100%. Results represent the means ± SD of 3 to 5 independent experiments (B-C) or are representative of 3 to 5 independent determinations (A), (*P < .05; **P < .005 compared with WT leukocytes).

and *Cxcr4*^{1013/1013} mice obtained by intercrossing heterozygous mice, immunodetection of Cxcr4 similarly revealed 1 band, suggesting that mutant and WT receptors cannot be distinguished in size (supplemental Figure 1D). Collectively, these data strongly suggest that the Cxcr4¹⁰¹³ receptor is expressed with its WT counterpart in *Cxcr4*^{+/-1013} mice and exerts a functional prevalence through a dominant effect.

***Cxcr4*^{+/-1013} mice develop normally but are profoundly lympho-neutropenic**

Cxcl12 and Cxcr4 play an essential role in embryogenesis and are notably critical for heart, brain, lung, and blood vessel development.¹³ In contrast to mice with targeted deletion of *Cxcl12* or *Cxcr4*, which die between embryonic days 15 and 18 of gestation, *Cxcr4*^{+/-1013} mice were viable and their development seemed normal. Histologic analyses of *Cxcr4*^{+/-1013} mice showed no apparent morphologic abnormality in the myocardium architecture, cerebellum organization, Peyer patches architecture and distribution, and Malpighi's glomerulus structure (supplemental Figure 2). Collectively, together with the fact that *Cxcr4*^{+/-1013} mice display no

alterations in weight and growth rate, these data indicate that the gain of Cxcr4 function has no deleterious developmental effects.

We then investigated how impaired Cxcr4 desensitization impacts on leukocyte homeostasis. In the peripheral blood, *Cxcr4*^{+/-1013} mice had ~80% fewer leukocytes than their WT littermates (Figure 2A). In *Cxcr4*^{+/-1013} mice, although the frequency of circulating CD8⁺ T cells was unaltered, that of CD4⁺ T cells and Gr1⁺ neutrophils increased, whereas the proportion of the CD19⁺ B cells decreased (Figure 2B). However, the absolute number of each blood leukocyte subpopulation was significantly reduced in *Cxcr4*^{+/-1013} mice (Figure 2C). *Cxcr4*^{+/-1013} mice also displayed a significant monocytopenia (data not shown). All *Cxcr4*^{+/-1013} mice tested exhibited a severe leukopenia, demonstrating a complete penetrance of the mutated allele in mice. We also assessed to what extent the gain of Cxcr4 function affected basal humoral immunity. Serum levels of natural IgA were similar in nonmanipulated *Cxcr4*^{+/-1013} and WT mice, whereas IgM and IgG increased in *Cxcr4*^{+/-1013} mice (Figure 2D). Combined with the reduced frequency and number of circulating B cells, these results suggest that B-cell trafficking or compartmentalization is compromised in *Cxcr4*^{+/-1013} mice.

Impaired Cxcr4 desensitization does not affect granulopoiesis

In contrast to other forms of inherited neutropenia, WS is not usually linked to life-threatening infections because acute infection or prophylactic treatment (eg, granulocyte colony-stimulating factor) transiently corrects the peripheral neutropenia.²⁰ This suggests that the neutropenia results from a defect in BM release of neutrophils, rather than from a production defect, a mechanism that fits well with the regulation of neutrophil homing and egress from

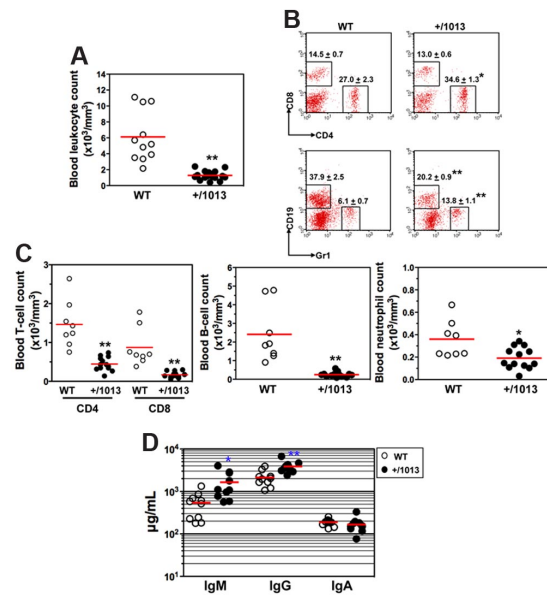


Figure 2. Disturbed leukocyte homeostasis in the blood of *Cxcr4*^{+/-1013} mice. (A) Absolute numbers of leukocytes were determined in blood samples. (B-C) Blood samples were stained with indicated mAbs, and the frequencies (mean ± SD, n = 8-13; B) and absolute numbers (C) of total CD4⁺ or CD8⁺ T cells (gated CD3⁺), B cells (gated CD19⁺), and neutrophils (gated Gr1⁺) are shown. (D) Sera total Igs were analyzed. Results of all analyzed littermates are shown (A,C,D). Lines indicate the mean and each circle indicates an individual mouse. (B) Each dot-plot represents one mouse (*P < .05; **P < .005 compared with WT mice).

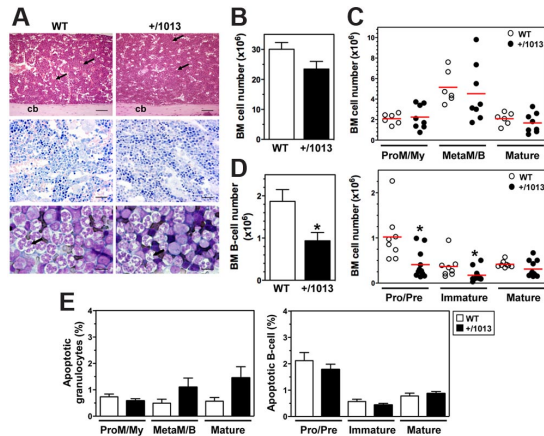


Figure 3. B-cell, but not granulocyte, development is altered in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. (A) H&E and Giemsa staining of longitudinal sections of paraffin-embedded decalcified tibia. Shown are some venous sinuses (arrows) and the cortical bone (cb). In the representative May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining of BM aspirates (bottom), most of the cells are neutrophils and some have hypersegmented nuclei (arrows). Original magnification, $\times 40$ (H&E), $\times 100$ (Giemsa), and $\times 400$ (MGG); scale bars denote 500, 250, and 25 μm , respectively. (B-D) Absolute numbers (mean \pm SD, $n = 14-19$) of BM cells were determined from 2 femurs (B) and analyzed for the content (C) in promyelocytes/myelocytes (ProM/My), metamyelocytes/band forms (MetaM/B), and mature neutrophils (Mature), and (D) in total B cells (mean \pm SD, $n = 8-11$; left) and (right) pro/pre-B cells, immature, and mature B-cell subsets (Mature). (E) Caspase-3 activation was used to detect apoptotic BM neutrophils and B cells. Results are from all the analyzed littermates (B-D), are from 3 to 5 independent experiments (E), or are representative of 3 to 5 independent determinations (A), (* $P < .05$ compared with WT mice).

the BM by the *Cxcl12*–*Cxcr4* interaction.²¹ Thus, the WS-associated gain of *CXCR4* function may cause the exaggerated retention of neutrophils in the BM. We found no difference in BM architecture and cellularity between WT and *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice using histologic analyses and microscopic cell enumeration (Figure 3A-B; Table 1). Similarly, analysis of *CD11b* and *Gri1* expression in BM aspirates did not show differences in both the number and frequency of granulocyte subsets (Figure 3C and supplemental Figure 3A). These results suggest that the gain of *Cxcr4* function does not disturb BM granulocyte development, as has been reported in patients.^{1,22}

Next, we searched for the presence of vacuolated neutrophils with hypersegmented nuclei connected by long filaments, the morphologic features of WS patients BM smears (ie, the pathognomonic myelokathexis). We did not detect any vacuolated neutrophils in WT and *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ BM (Figure 3A). Although hypersegmented neutrophils were easily detected in the BM smears from *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, their frequency ($\sim 7\%$ of total neutrophils) was similar in WT mice, suggesting that they do not feature mutant mice but are part of neutrophil homeostasis. This phenomenon is actually not specific to the mouse model, because some hypermature neutrophils with pyknotic nuclei also can be recovered from the BM of humans (3%-14% and $\sim 55\%$ in healthy and WS individuals, respectively).²³ The histologic pattern of BM biopsies from WS patients is consistent with apoptosis of mature myeloid cells as a consequence of their abnormal BM sequestration, although the formal demonstration has never been made.²⁰ Thus, we searched for these cells in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice using another experimental approach based on the quantification by flow cytometry of cleaved caspase-3. A sizable pool of apoptotic neutrophils was detected similarly in the BM of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ and

WT mice (Figure 3E). Therefore, the gain of *Cxcr4* function results in a circulating neutropenia that occurs in the context of normal granulocyte maturation and is associated with neither a significant increase of mature neutrophils nor their exacerbated apoptosis in the BM. These data further indicate that impaired *Cxcr4* desensitization does not cause myelokathexis.

Altered B- and T-cell development accounts for chronic lymphopenia

In the postnatal life, the *CXCL12/CXCR4* axis regulates the BM homing and retention of hematopoietic progenitor cells (HPCs) and is involved in B-cell lymphopoiesis. Because *CXCR4* is virtually expressed on all B-cell subpopulations, changes in *CXCL12* responsiveness that occur throughout B-cell ontogeny were proposed to result from differences in the activation of *CXCR4*-mediated signaling.²⁴ Thus, the gain of *Cxcr4* function could affect B-cell development. Both frequency and absolute number of total *CD19*⁺ B cells were slightly, but significantly, lower in the BM from *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (Figure 3D and supplemental Figure 3B). In contrast to the myeloid series, B-cell differentiation was altered in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. Indeed, although the frequency of immature B cells was unchanged, that of pro/pre-B cells was reduced, and that of mature recirculating B cells was increased (supplemental Figure 3B). Consequently, the absolute number of pro/pre-B cells, and to a lesser extent of immature B cells, was reduced in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (Figure 3D). Pro/pre-B cells and other B-cell subsets from *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice displayed a low rate of apoptosis similar to that of the corresponding WT B-cell subpopulation (Figure 3E). Therefore, the alteration of early B-cell development in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice was not associated with enhanced cell death.

In mammals, T-cell development mainly occurs in the thymus and is governed by a chemokine-dependent homing of hematopoietic progenitors, and relies on the cooperative action of the *Ccl25/Ccr9*, *Ccl21/Ccr7*, and *Cxcl12/Cxcr4* pairs.¹² We found no impact of the gain of *Cxcr4* function on thymus wet weight and architecture (supplemental Figure 4A-B). Double-positive and single-positive thymocytes localized to the cortex and the medulla,

Table 1. Bone marrow morphology

	<i>Cxcr4</i> ^{+/+}	<i>Cxcr4</i> ⁺¹⁰¹³
Cell type		
Myeloblasts	1*	0.9
Promyelocytes	1.3	0
Myelocytes	8.8	8
Metamyelocytes/band cells	7.1	6.5
Neutrophils	21.5	31.7
Eosinophils	0	0
Basophils	0	0
Total myeloid cells	39.7	47.1
Proerythroblasts	0	0
Basophilic	1.5	0.5
Polychromatophilic	17	16.2
Acidophilic	9.2	4.7
Total erythroid cells	27.7	21.4
Lymphocytes	32.6	31.5
Plasmocytes	0	0
Monocytes	0	0
Reticulum cells	0	0
M/E ratio†	1.4	2.2

*Results are expressed as percentage of total cells.

†M/E ratio indicates myeloid:erythroid ratio.

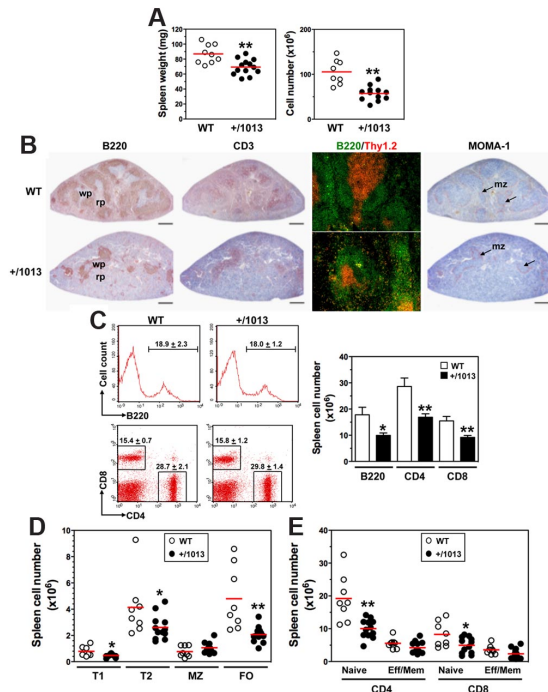


Figure 4. Decreased numbers of splenic B and T cells in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. (A) Spleen wet weight (left) and total cell number (right) were determined. (B) Spleen sections were immunostained for B220, CD3, or MOMA-1 (brown) or for B220 (green) and Thy1.2 (red). Marginal zone (mz), white pulp (wp), and red pulp (rp) are indicated. Original magnification, $\times 40$ (B220, CD3 and MOMA-1) and $\times 200$ (B220/Thy1.2); scale bars denote 500 μm . (C) Frequencies (mean \pm SD, n = 8-12; left) and absolute numbers (right) of total spleen B cells (gated B220⁺CD3⁻) and T cells (gated B220⁻CD3⁺CD4⁺ or CD8⁺) are shown. (D-E) Absolute numbers of (D) transitional (type T1 and T2), marginal zone (MZ), and follicular (FO) B cells, and of (E) naive and effector/memory (Eff/Mem) CD4⁺ or CD8⁺ T cells, as determined in supplemental Figure 5. Results are from all the analyzed littermates (A-C-E), are from 1 representative mouse (C, left) or are representative of 3 independent determinations (B). Lines indicate the mean and each circle indicates an individual mouse (A,D-E), (**P* < .05; ***P* < .005 compared with WT mice).

respectively, suggesting that thymocyte segregation occurred normally in mutant mice. Moreover, *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ and WT mice displayed similar frequencies of double-negative, double-positive, and single-positive thymocytes (supplemental Figure 4C). However, in accordance with the $\sim 30\%$ reduction in thymus cellularity (supplemental Figure 4A), the absolute number of each thymic subset (from progenitors to mature single-positive thymocytes) was significantly decreased in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (supplemental Figure 4D). Therefore, impaired *Cxcr4* desensitization does not disturb thymus organization but affects the homing, differentiation, or expansion of early T-cell progenitors. Together, these findings reveal that altered *Cxcr4*¹⁰¹³-driven development of B and T cells leads to chronic circulating lymphopenia.

***Cxcr4* activation governs peripheral lymphocyte compartmentalization**

We sought to delineate how the disturbed lymphopoiesis in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice alters trafficking and distribution of B and T cells in the spleen, LNs, and peritoneal cavity (PerC), processes that involve the *Cxcl12/Cxcr4* axis.²⁵⁻²⁷ *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice had $\sim 20\%$ and 45% lower spleen wet weight and cellularity, respectively, than WT mice (Figure 4A). Histologic analyses revealed a dramatic

reduction of primary B-cell follicles in the spleen of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (Figure 4B). However, the few B and T cells detected were adequately compartmentalized within the white pulp, with T cells being surrounded by B-cell follicles. In addition, the marginal zone (MZ) was preserved in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, as revealed by the normal distribution of MOMA-1⁺ metallophilic macrophages. This context suggested reduced B- and T-cell numbers. Consistently, the total number of B220⁺ B cells and CD4⁺ or CD8⁺ T cells decreased by $\sim 40\%$ to 45% in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (Figure 4C). Immature B cells from the BM emerge into the spleen as transitional B cells of type 1 and then develop into B cells of type 2 that give rise to 2 subsets of long-lived mature B cells, MZ and follicular (FO) B cells. Numbers of both type 1 and type 2 B cells were reduced as well as that of FO B cells ($> 50\%$), whereas the MZ B-cell subset was maintained (Figure 4D). Thus, in the spleen of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, FO B cells represented a smaller fraction that is counterbalanced by the MZ B-cell subpopulation (supplemental Figure 5A). Analysis of T-cell subsets indicated that the total numbers of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells decreased by $\sim 50\%$ and 40%, respectively, in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, whereas the decrease in effector/memory cells was lower (Figure 4E). No imbalance in the proportion of each T-cell population was detected in the spleen of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (supplemental Figure 5B).

In contrast to the follicular hypoplasia detected in the spleen, LNs displayed an increase in the absolute number of total cells,

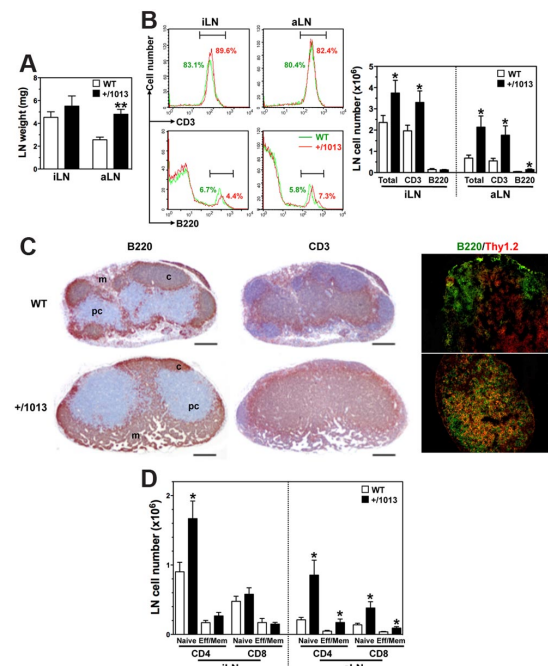


Figure 5. Increased numbers of LN T cells in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. (A-B) The wet weights (mean \pm SD, n = 6-10; A) of inguinal (i) and axillary (a) LNs were determined as well as (B) total cell numbers, frequencies (left), and absolute numbers (right) of total B and T cells. (C) aLN sections were immunostained for B220, CD3 (brown), or for B220 (green) and Thy1.2 (red). Cortex (c), paracortex (pc), and medullary (m) areas are indicated. Original magnification, $\times 40$ (B220 and CD3) and $\times 200$ (B220/Thy1.2); scale bars denote 500 μm . (D) Absolute numbers (mean \pm SD) of naive and effector/memory (Eff/Mem) CD4⁺ or CD8⁺ T cells in peripheral LNs are shown. Results are from all the analyzed littermates (A,B,D), are from 1 representative mouse (B, left), or are representative of 3 independent determinations (C), (**P* < .05; ***P* < .005 compared with WT mice).

mostly composed of CD3⁺ T cells (Figure 5A-B). Immunostaining revealed a disorganized architecture characterized by the absence of B-cell follicles and an unfurling of the T-cell zone at the expense of the B-cell one (Figure 5C). As expected, high endothelial venules (HEVs) in WT mice were predominantly localized in T-cell zones such as the paracortical area, but they also were found at the periphery of primary follicles. Although HEVs were readily detected in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, their distribution was abnormally scattered, thus mirroring the disorganization of T- and B-cell zones (supplemental Figure 5C). Surprisingly, fewer and abnormally localized vessels were positive for the LN lymphatic vessels (LNLVs) marker LYVE-1 in mutant mice. The architecture of Peyer patches, the formation of which follows a scheme highly similar to that of LNs, was found to be normal in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (supplemental Figure 2F). Flow cytometric analyses of the LN T-cell compartment indicated an increased frequency of CD4⁺ T cells at the expense of that of CD8⁺ T cells (supplemental Figure 5D). The proportions of naive and effector/memory T cells remained unchanged in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, whereas their number tended to be higher with a significant increase in naive CD4⁺ T cells (Figure 5D). Similarly to the spleen and LNs, the gain of Cxcr4 function impaired B-cell compartmentalization in the PerC, where B2 and B1b cells, which primarily derive from BM precursors, were reduced in favor of B1a cells that are known to develop from fetal liver precursors (supplemental Figure 6). Taken together, these data unveil altered Cxcr4¹⁰¹³-mediated trafficking of lymphocytes between lymphoid organs and the peripheral blood.

Blockade of Cxcr4-dependent signaling reverses leukopenia

The main challenge in understanding the WS pathogenesis is to develop selective and safe therapies for chronic use aimed at correcting the gain of CXCR4 function and associated clinical manifestations. To this end, we analyzed the impact of the first licensed CXCR4 antagonist AMD3100 (or plerixafor) approved for BM HPC mobilization and transplantation²⁸ but also, of chalcone-4, a CXCL12-neutralizing molecule that has shown efficacy in vivo in a mouse model of asthma.²⁹ Whereas AMD3100 is a selective and competitive CXCR4 antagonist, chalcone 4 binds CXCL12 and prevents signaling through CXCR4; thus, it is expected to leave the basal activity of the receptor unchanged. With others, we reported previously that AMD3100 rescued the gain of CXCR4 function in patient-derived cells.^{4,30} Here, we show that single intraperitoneal injection of either AMD3100 or chalcone 4 increased within 3 hours the absolute numbers of total leukocytes in the blood of WT mice, including neutrophils, B and T cells (Figure 6A and supplemental Figures 7 and 8). Importantly, in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, both drugs reversed circulating panleukopenia. Strikingly, AMD3100-induced leukocytosis was mirrored by a measurable but not significant reduction ($P \geq .1$) in BM neutrophil and B-cell numbers in WT, but not in mutant mice (Figure 6B). Although the precise location of the mobilizable pool of leukocytes remains to be delineated, the BM could constitute a source of AMD3100-mobilized neutrophils and B cells.^{21,31} The relative short half-life (0.9 hour) of AMD3100 in rodents together with the gain of Cxcr4 function, which may force the homing of peripheral leukocytes to the BM, could account for the unexpected preserved leukocyte count in the BM of mutant mice. Alternatively, but not exclusively, this stability might reflect the recruitment of leukocytes from additional sources than the BM (eg, LNs). Collectively, these results together with 2 recent studies revealing that acute administration of plerixafor to WS patients corrected leukopenia

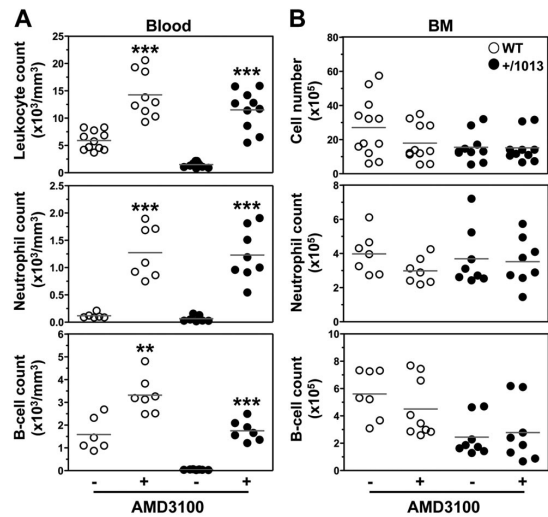


Figure 6. AMD3100-promoted reversion of lymphopenia in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. (A) Absolute numbers of total leukocytes, CD19⁺ B cells, and Gr1⁺ neutrophils were determined in the blood 3 hours after intraperitoneal injection of AMD3100 (+) or PBS (-). (B) Absolute numbers of total BM cells, CD19⁺ B cells, and SSC^{high}Gr1⁺ neutrophils were simultaneously determined from 1 tibia. Results of all analyzed littermates are shown (A-B). Lines indicate the mean and each circle indicates an individual mouse (** $P < .005$; *** $P < .0005$ compared with PBS-treated mice).

provide evidence for the causal role of the gain of CXCR4 function in the panleukopenia.^{32,33} They support the validity of this mouse as a preclinical model of WS-related immunohematologic manifestations for testing new pharmacologic agents for chronic use and to gain insight into their mode of action.

Discussion

Using combined genetic, biochemical, and pharmacologic approaches, we established that proper desensitization of Cxcr4 is required for B- and T-cell development and the trafficking of lymphocytes and neutrophils between the peripheral blood and lymphoid organs under homeostatic conditions. Because of the exacerbated Cxcl12-promoted chemotaxis of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ leukocytes, lymphopenia in mutant mice might primarily result from impaired trafficking that skews the tissue distribution of leukocyte subsets.

Patients carrying the orthologous *CXCR4* mutation that causes the WS commonly exhibit a severe B- and T-cell lymphopenia.^{20,34} In 3 patients, the proportions of circulating switched and unswitched memory B cells were reduced.⁵ In search of a potential central defect, analyses were extended to BM B-cell subsets in one patient, but they indicated that B-cell precursors, immature, and mature B cells were normally represented.⁵ In contrast, the BM of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice displays a defect in CD19⁺ B cells that selectively affects the number of B-cell precursors and that is not the consequence of an increased rate of apoptosis. We presume that the population of recirculating mature B cells that is quantitatively preserved in the BM probably originates from the periphery. Adoptive cell transfer experiments would help to delineate this issue. Mice deficient in *Cxcl12* or *Cxcr4* lack B-cell lymphopoiesis,¹³ and selective

inactivation of *Cxcr4* in B cells results in the premature migration of B-cell precursors from the BM and their abnormal accumulation in follicles of the spleen and intestinal lamina propria.²⁶ Conversely, we found that the gain of *Cxcr4* function correlates with a decreased number of immature B cells in the spleen and the PerC, underscoring a pivotal role for the Cxcl12/*Cxcr4*-dependent chemotaxis in regulating B-cell homeostasis. The observation that the B1a-cell subset is maintained, and even increased, in the PerC indicates that antenatal B-cell lymphopoiesis occurs efficiently in the fetal liver of mutant mice.

Cxcr4^{+/*1013*} mice also exhibited a diminished number of spleen B-cell follicles in a context of unaltered lymphocyte compartmentalization and preserved integrity of the MZ, suggesting that impaired *Cxcr4* desensitization alters entry of transitional B cells through the marginal sinus. Although mature FO B cells also were reduced, the population of MZ B cells was surprisingly preserved. Thus, the gain of *Cxcr4* function may increase retention or survival of MZ B cells into Cxcl12-expressing MZ bridging channels²⁵ and differentially affect signals that control the generation of MZ versus FO B cells (eg, B-cell receptor signal strength, *Cxcr7* expression, Notch-2 or E proteins).^{35,36} Hypogammaglobulinemia, which most frequently involves IgG but also may affect IgA and IgM, constitutes a clinical sign variable among WS patients with moderate deficiency to normal levels of Igs.^{20,34} Nonmanipulated mutant mice exhibited normal or even higher serum titers of IgG and IgM than their WT littermates. Serum levels of natural IgA also were preserved in *Cxcr4*^{+/*1013*} mice, consistent with the normal architecture, distribution, and number of Peyer patches. Thus, hypogammaglobulinemia did not seem related to the gain of *Cxcr4* function or to the degree of B-cell lymphopenia. It might manifest in a higher susceptibility to respiratory infections, as suggested by the beneficial effect of intravenous Ig therapy in a subset of patients.²⁰ Challenging the mice with pathogens will help to delineate this issue.

WS patients generally exhibit robust responses after immune challenges, indicating that humoral immunity is not completely defective in this context of B-cell lymphopenia. However, evidence also suggest that patients fail to maintain antigen-specific Ab production, which is manifested by reduced circulating memory B cells.^{5,34,37} Impaired B-cell memory responses (ie, somatic hypermutation and isotype switching) were reported in one patient on experimental immunization.³⁸ Moreover, poorly formed lymphoid follicles and reduced B-cell numbers were reported on inguinal LN biopsies after diphtheria and tetanus vaccine in 2 patients.²² Here, we uncovered a new role for *Cxcr4*-dependent signaling in the organization of LNs. Nonmanipulated *Cxcr4*^{+/*1013*} mice bred under pathogen-free conditions displayed disorganized LNs, featured by an abnormal expansion of the T-cell zone and the absence of B-cell follicles. This suggests that T- and B-cell contacts are not restricted to anatomically defined structures and thus may interfere with B-cell fate and maturation. Interestingly, follicular dendritic cells ablation leads to disrupted follicular organization and, in the course of immunization, the disappearance of germinal centers and the dispersal and death of associated B cells.³⁹ Immunization of *Cxcr4*^{+/*1013*} mice will help determine whether the gain of *Cxcr4* function affects germinal center formation, T- and B-cell maturation, and hence production and trafficking of memory B and plasma cells.

T-cell lymphopenia in WS patients, which was thought to result from an abnormal egress from the thymus or trapping into

secondary lymphoid organs, is associated with a marked reduction of circulating naive T cells and TCR excision circles.⁵ However, here we unraveled that all thymic cell subsets—from progenitors to mature single-positive thymocytes—were reduced in mutant mice, indicating that the gain of *Cxcr4* function disturbs thymus homing, development, or expansion of early T-cell progenitors. Also, mice reconstituted with T-cell progenitors expressing a Cxcl12 intrakine that retains *Cxcr4* intracellularly display a T-cell lymphopenia and an impaired intrathymic maturation.⁴⁰ This supports the finding that *Cxcr4* contributes to the homing and settling of T-cell progenitors in the thymus.¹² Cxcl12 expressed by the thymic epithelium plays a role in the survival, expansion, and subsequent differentiation of CXCR4-expressing early T-lymphoid progenitors.^{10,11} Analyses of *Cxcr4*^{+/*1013*} mice designate a developmental defect at one of the early double-negative stages of thymocyte maturation as causative in the decreased peripheral T-cell numbers. HPC transfer and immune reconstitution in immunodeficient mice will establish whether the lymphopenia displayed by *Cxcr4*^{+/*1013*} mice results from a hematopoietic cell-intrinsic defect. In the periphery, the situation is probably complex as the spleen and LNs display opposite phenotypes. In the spleen, one can speculate that T-cell reduction reflects either the lymphopenia in the bloodstream or a defective entry of residual circulating T cells through the marginal sinus. By contrast, an increased number of naive, and to a lesser extent of effector/memory, T cells was detected in LNs. Because the HEV network was apparently preserved, we anticipate that the T-cell entry into LNs is not affected in *Cxcr4*^{+/*1013*} mice. However, the abnormal pattern of LYVE-1⁺ LNLVs suggests an impaired egress as the main mechanism accounting for T-cell accumulation in this organ. The inverse correlation between T cells and LNLVs extends the negative role of T cells in LNLV formation⁴¹ and further underscores the dependence of LN organization on proper *Cxcr4* activation. Whether disturbance of additional organizers such as the reticular network, which expresses Cxcl12 and others chemokines (ie, Ccl-19 and -21), might contribute to the phenotype of *Cxcr4*^{+/*1013*} mice and ultimately affect T-cell homeostasis will be the focus of future investigations.

Two animal models have analyzed the consequences of the gain of CXCR4 function on neutrophil biology. First, in the zebrafish, expression of a WS-associated CXCR4 induced a peripheral neutropenia concomitant to a normal neutrophil development.⁴² Second, expressing a WS truncation mutation of *CXCR4* into healthy human HPCs enhanced their engraftment into the BM of NOD/SCID mice and thereafter decreased recovery of CD45⁺ leukocytes from the blood.⁴³ Neither neutrophil aggregation at the sites of high CXCL12 expression in the transgenic zebrafish nor the accumulation of leukocytes in the BM of engrafted mice was associated with a severe cell death.^{42,43} *Cxcr4*^{+/*1013*} mice, which are the first model mimicking the “homeostatic” coexpression of WT and mutant *Cxcr4* receptors of WS patients, unambiguously demonstrate the linkage between the gain of *Cxcr4* function and the WS-associated neutropenia. Peripheral neutropenia was found despite normal representation of the different cellular stages of granulocyte development. Moreover, neutrophils exhibited a normal rate of apoptosis in the BM. These observations suggest that proper desensitization of *Cxcr4* is not critical for granulopoiesis and clearance of senescent neutrophils under homeostatic conditions proceeds normally in the BM of *Cxcr4*^{+/*1013*} mice. A corollary is that impaired CXCR4 desensitization is unlikely to

be the primary cause of the patient-associated myelokathexis. The basis for this phenotype remains to be characterized but could rely on the fact that neutrophil clearance by BM macrophages reported in mice⁴⁴ might be less robust or differentially regulated in man.⁴⁵ In vivo studies of aged neutrophils clearance could help to determine the relative contribution of the BM versus spleen and liver in this process. Alteration of additional mechanisms involved in neutrophil retention (ie, Rac2)⁴⁶ or egress (ie, Cxcr2)⁴⁷ also can be invoked. Although granulopoiesis was maintained in mutant mice, impaired Cxcr4 desensitization impacted on B- and natural killer cell development, as we found that immature *Cxcr4*^{+/1013} natural killer cells abnormally accumulated in the BM parenchyma area.⁴⁸ Thus, these findings unveil differential requirements for these leukocyte lineages on Cxcr4-mediated signaling.

The first pharmacologic evidence of the causal role of CXCR4 hyperactivity in WS-associated panleukopenia recently came from 2 independent phase I clinical trials based on acute administration of AMD3100.^{32,33} It is unclear from which compartment leukocytes were mobilized, although studies suggested the BM as a possible source. Here, we found that blockade of the gain of Cxcr4 function was effective in releasing leukocytes in the blood. However, even though neutrophils and B cells seemed to be preferentially mobilized from the BM in WT mice, this was apparently not the case for *Cxcr4*^{+/1013} mice, suggesting other sources from which leukocytes are mobilized. This interesting difference with regard to treatment responses indicates that *Cxcr4*^{+/1013} mice will be useful for dissecting the distinct mechanisms governing the sequestration and mobilization of the different leukocyte subsets. Because management of WS will need chronic treatment aimed to normalize, but not abolish, CXCR4 signaling, these mice set a model for investigation of known CXCR4 antagonists, the long-term safety of which may be questioned (ie, AMD3100^{49,50}), and for the characterization of alternative new inhibitory compounds. Finally, exploration in *Cxcr4*^{+/1013} mice of the mechanisms of leukocyte development and trafficking between lymphoid organs will help to define how proper CXCR4 signaling contributes to these processes under homeostatic conditions and in the course of immune responses.

References

- Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, Lofness KG, Pittelkow MR, Fenyk JR Jr. WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet*. 2000;91(5):368-376.
- Wetzler M, Talpaz M, Kellagher MJ, Gutterman JU, Kurzrock R. Myelokathexis: normalization of neutrophil counts and morphology by GM-CSF. *JAMA*. 1992;267(16):2179-2180.
- Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003;34(1):70-74.
- Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*. 2005;105(6):2449-2457.
- Gulino AV, Moratto D, Sozzani S, et al. Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*. 2004;104(2):444-452.
- Kawai T, Choi U, Whiting-Theobald NL, et al. Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome. *Exp Hematol*. 2005;33(4):460-468.
- Lagane B, Chow KY, Balabanian K, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*. 2008;112(1):34-44.
- McCormick PJ, Segarra M, Gasperini P, Gulino AV, Tosato G. Impaired recruitment of Grk6 and beta-Arrestin 2 causes delayed internalization and desensitization of a WHIM syndrome-associated CXCR4 mutant receptor. *PLoS One*. 2009;4(12):e8102.
- Balabanian K, Levoe A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1074-1084.
- Tramont PC, Tosello-Tramont AC, Shen Y, et al. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol*. 2010;11(2):162-170.
- Janas ML, Turner M. Stromal cell-derived factor 1alpha and CXCR4: newly defined requirements for efficient thymic beta-selection. *Trends Immunol*. 2010;31(10):370-376.
- Calderón L, Boehm T. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(18):7517-7522.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myeloopoiesis, and derelated cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9448-9453.
- Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14726-14729.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-599.
- Gasparik V, Daubeuf F, Hachet-Haas M, et al. Prodrugs of a CXC chemokine-12 (CXCL12) neutraligand prevent inflammatory reactions in an

Acknowledgments

The authors thank F. Arenzana-Seisdedos (Laboratoire de Pathogénie Virale, Institut Pasteur, Paris, France) who encouraged them to perform the mouse mutant line. They are grateful to M. Huerre (Institut Curie, Paris, France) for his invaluable advice, and F. Baleux (Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris, France) for providing CXCL12. They also thank P. Avé (Histopathologie Humaine et Modèles Animaux, Institut Pasteur, Paris, France) for excellent technical assistance in the histologic analysis as well as F. Gaudin and P. Hemon (Plateforme d'Histologie, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Châtenay-Malabry, France) and J. Harriague (4Clinics, Paris, France) for editing the manuscript.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR; 2010 JCJC 1104 01) and the European Union FP6 (INNOCHEM, LSHB-CT-2005-518167, K.B.); and ANR (ANR-07-MRAR-029), AP-HP, and E-rare (07 E-RARE 013-01, F.B.). K.B., E.B., V.B., L.B.-D., D.E., and F.B. are members of the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics supported by a grant from ANR (Investissements d'Avenir). The mouse mutant line was established at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) in the Targeted Mutagenesis and Transgenesis Department with funds from GIS-Institut des Maladies Rares, Inserm, and the Consortium National de Recherche en Génomique.

Authorship

Contribution: K.B. and F.B. designed research; E.B., V.B., L.B.-D., and E.L. performed research; D.B. provided calceon 4; K.B., F.B., E.B., V.B., L.B.-D., E.L., O.F., and L.F. analyzed data; O.F. and D.E. contributed analytic tools; E.B., V.B., L.B.-D., D.E., and L.F. edited the manuscript; and K.B. and F.B. wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

D.E. is deceased.

Correspondence: Karl Balabanian or Françoise Bachelier, Inserm UMR S996, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart, France; e-mail: karl.balabanian@u-psud.fr or francoise.bachelier@u-psud.fr.

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

5730 BALABANIAN et al

BLOOD, 14 JUNE 2012 • VOLUME 119, NUMBER 24

- asthma model in vivo. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(1):10-14.
- Balabanian K, Couderc J, Bouchet-Delbos L, et al. Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J Immunol.* 2003;170(6):3392-3400.
 - Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7805-7817.
 - Cronshaw DG, Nie Y, Waite J, Zou YR. An essential role of the cytoplasmic tail of CXCR4 in g-protein signaling and organogenesis. *PLoS One.* 2010;5(11):e15397.
 - Kawai T, Malech HL. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(1):20-26.
 - Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 2003;19(4):583-593.
 - Mentzer WC Jr, Johnston RB Jr, Baehner RL, Nathan DG. An unusual form of chronic neutropenia in a father and daughter with hypogammaglobulinemia. *Br J Haematol.* 1977;36(3):313-322.
 - Fenneteau O, Lainey E. Bone marrow examination of inherited diseases in children. *Ann Biol Clin.* 2007;65(5):483-503.
 - Palmasino E, Moepps B, Gierschik P, Thelen M. Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells. *Immunobiology.* 2006;211(5):377-389.
 - Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med.* 2001;194(1):45-56.
 - Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med.* 2004;200(9):1145-1156.
 - Bai Z, Hayasaka H, Kobayashi M, et al. CXCL12 chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naive T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J Immunol.* 2009;182(3):1287-1295.
 - Calandra G, Bridger G, Fricker S. CXCR4 in Clinical Hematology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;870:173-191.
 - Hachet-Haas M, Balabanian K, Rohmer F, et al. Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. *J Biol Chem.* 2008;283(34):23189-23199.
 - McDermott DH, Lopez J, Deng F, et al. AMD3100 is a potent antagonist at CXCR4(R334X), a hyperfunctional mutant chemokine receptor and cause of WHIM syndrome. *J Cell Mol Med.* 2011;15(10):2071-2081.
 - Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 2005;201(8):1307-1318.
 - Dale DC, Bolyard AA, Kelley ML, et al. The CXCR4 antagonist plerixafor is a potential therapy for myelokathexis, WHIM syndrome. *Blood.* 2011;118(18):4963-4966.
 - McDermott DH, Liu Q, Ulrick J, et al. The CXCR4 antagonist plerixafor corrects panleukopenia in patients with WHIM syndrome. *Blood.* 2011;118(18):4957-4962.
 - Tassone L, Notarangelo LD, Bonomi V, et al. Clinical and genetic diagnosis of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome in 10 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1170-1173.
 - Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606-616.
 - Wang H, Beaty N, Chen S, et al. The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *Blood.* 2012;119(2):465-468.
 - Handisurya A, Schellenbacher C, Reininger B, et al. A quadrivalent HPV vaccine induces humoral and cellular immune responses in WHIM immunodeficiency syndrome. *Vaccine.* 2010;28(30):4837-4841.
 - Mc Guire PJ, Cunningham-Rundles C, Ochs H, Diaz GA. Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol.* 2010;135(3):412-421.
 - Wang X, Cho B, Suzuki K, et al. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med.* 2011;208(12):2497-2510.
 - Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, Kitamura T, Ishikawa S, Matsushima K. Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakinase. *Blood.* 2000;96(6):2074-2080.
 - Kataru RP, Kim H, Jang C, et al. T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. *Immunity.* 2011;34(1):96-107.
 - Walters KB, Green JM, Surfus JC, Yoo SK, Huttenlocher A. Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood.* 2010;116(15):2803-2811.
 - Kawai T, Choi U, Cardwell L, et al. WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4. *Blood.* 2007;109(1):78-84.
 - Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology.* 2008;125(3):281-288.
 - Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol.* 2010;88(2):241-251.
 - Deng Q, Yoo SK, Cavnar PJ, Green JM, Huttenlocher A. Dual roles for Rac2 in neutrophil motility and active retention in zebrafish hematopoietic tissue. *Dev Cell.* 2011;21(4):735-745.
 - Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-2431.
 - Mayol K, Biajoux V, Marvel J, Balabanian K, Walzer T. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood.* 2011;118(18):4863-4871.
 - Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;37(2):1253-1262.
 - Dugan MJ, Maziarz RT, Bensinger WI, et al. Safety and preliminary efficacy of plerixafor (Mozobil) in combination with chemotherapy and G-CSF: an open-label, multicenter, exploratory trial in patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma undergoing stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(1):39-47.

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

Generation and Breeding of *Cxcr4*^{+/1013} mice

Mice were generated at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) following a knock-in strategy. Briefly, the targeting vector was constructed using a fragment encompassing the *Cxcr4* exon 2 amplified by PCR using 129Sv/Pas mice DNA as a template. The fragment was subcloned in a Mouse Clinical Institute proprietary vector that carries a Neomycin (Neo) resistance cassette flanked by loxP sites. The CT>GA mutation was generated by PCR and the fragment was inserted into the final targeting vector that contained 5' and 3' homology arms. Mouse 129S2/SvPas Embryonic Stem (ES) cells were electroporated with the linearized construct. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and by Southern blot using 5' and 3' external probes and a Neo probe. Two positive ES clones were injected into C57BL/6J blastocysts, and the resulting chimeric males were mated to C57BL/6J females to give germ-line transmission of the knock-in *Cxcr4* allele (Supplemental Figure 1).

Mice were bred in our animal facilities on a 12-hours light/dark cycle and under specific pathogen-free conditions. All the data were obtained from 8–12-week-old mice. Mice were genotyped by PCR on genomic DNA using the oligonucleotide primers P1 (ATTTATGGCTTCCCGGAGACCCTC), P2 (ACACATTTATGGCTTCCCGGAGACC), and P3 (CTTTAATCTCACTCAGCTCTGGCGAG) corresponding to a sequence of exon 2 and loxP, to distinguish the mutated and the endogenous *Cxcr4* allele. The authors obtained the agreement delivered by licensing committee to experiment on animals. Animal houses are pathogen-free facilities and animal care, handling, and experimentation were approved by the local Ethics Committee for Animals and complied with French and European guidelines for the use of laboratory animals.

Mouse model of WHIM Syndrome

Reagents, Cell culture, and Transfection

Chalcone 4 prodrug was prepared as described in¹. Briefly, chalcone 4, [(E)-1-(4'-chlorophenyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one] was obtained by condensing para-chlorophenyl-methyl ketone with methoxymethyl ether vanillin (Van-MOM). The MOM protecting group was removed by acidic treatment to yield chalcone 4. Chalcone 4 was then condensed with phosphoryl chloride in anhydrous conditions to obtain chalcone 4-phosphate. HEK-293T (HEK) cells were grown in culture medium (Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum [FCS], 4.5 g/L glucose, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 1 mM glutamine, and 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid); all reagents were from Invitrogen. Dr. M. Thelen (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland) provided the plasmid encoding murine *Cxcr4*. Transient expression of *Cxcr4* was done using the transfection reagent FuGene 6 method (Roche Diagnostics) and verified 48 hours later by flow cytometry.

Mice samples isolation

Isolation of mice samples was performed upon anesthesia with intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg), purchased at Centravet. The peripheral blood was collected by cardiac puncture, and the Unopette[®] microcollection system (BD VACUTAINER System) was then used for leukocyte recovery and quantification according to the manufacturer's instructions. BM was harvested from femurs or tibia by flushing with ice-cold PBS 10% FCS. Peritoneal cells were recovered by washing with 20 mL of PBS. LNs, thymus, and spleen were gently mashed on a 70- μ m nylon mesh and cells recovered were then suspended in PBS 2% FCS. Spleen cells were suspended in PBS 2% FCS after red blood cell lysis. Cells harvested from tissues were incubated at 37°C for 60 min before performing functional assays and chemokine receptor staining.

2

Functional Assays

Chemotaxis was performed using a Transwell® assay as previously described². Briefly, 1×10^6 thymocytes or 0.1×10^6 blood leukocytes were suspended in 150 μ L RPMI medium supplemented with 20 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) and 0.5% bovine serum albumin (BSA) and placed into the upper chamber of a 6.5-mm diameter, 5- μ m pore polycarbonate Transwell® culture insert. The same media, containing or not a chemokine, was placed in the lower chamber and chemotaxis proceeded for 2 hours at 37°C in humidified air with 5% CO₂. Chemokines were used at the indicated concentrations and AMD3100 (1 μ M) was added in both chambers. The fraction of cells migrating across the polycarbonate membrane was calculated as follows: $\{[(\text{number of cells migrating to the lower chamber in response to chemokine}) - (\text{number of cells migrating spontaneously})] / \text{number of cells added to the upper chamber at the start of the assay}\} \times 100$. Results are expressed as a percentage of input cells that migrated to the lower chamber.

Chemokine receptor internalization was analyzed as previously described³ with some minor modifications. Briefly, 1×10^6 thymocytes were incubated at 37°C for 45 min with indicated concentrations of chemokine. The reaction was stopped by adding ice-cold RPMI and brief centrifugation at 4°C. After one wash in acidic glycine buffer (pH 4.3), levels of Cxcr4 or Ccr9 cell surface expression were determined by flow cytometry in combination with those of CD3, CD4 and CD8 antigens. Background fluorescence was evaluated using the corresponding PE-conjugated immunoglobulin-isotype control Ab. Receptor expression in stimulated cells was calculated as follows: $(\text{receptor geometric MFI of treated cells} / \text{receptor geometric MFI of unstimulated cells}) \times 100$; 100% correspond to receptor expression at the surface of cells incubated in medium alone.

Apoptosis was measured using the Active Caspase-3-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Briefly, BM cells were suspended

Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Mouse model of WHIM Syndrome

in BD Cytotfix/Cytoperm[®] at a concentration of 2×10^6 cells/mL and incubated for 20 min on ice. After 3 washes with BD Perm/Wash[®] buffer, cells were incubated for 30 min at room temperature with 20 μ L of FITC-conjugated anti-active Caspase-3 (clone C92-605, rabbit IgG) Ab in combination with fluorescent mAbs specific for CD19, B220 and IgM antigens to delineate by flow cytometry B-cell subsets or for CD11b and Gr1 antigens to delineate granulocytes subsets.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Sera were harvested upon mice bleeding by retro-orbital puncture under anesthesia and total levels of Ig were determined by ELISA, as previously described², with some modifications. Briefly, sera were placed overnight at 4°C on wells coated with goat Abs to mouse μ - or γ -chain (Southern Biotech) at 3 μ g/mL. Standard curves were obtained with murine IgG, IgM and IgA (Southern Biotech). The plates were then incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG Fc-specific (Sigma), goat anti-mouse IgM (Jackson Immunoresearch) and goat anti-mouse IgA (Southern Biotech) Abs. After incubation with *the* 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) substrate (Sigma), the reaction was stopped by adding 0.05 M citric acid and 0.01% sodium azide. The plates were read at OD_{405 nm}.

Histological Analyses

Organs were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 μ m) were stained with hematoxylin-eosin (H&E). For immunohistochemistry, tissues were fixed for 48 hours in Tris buffer pH 7 containing zinc acetate (0.5%), zinc chloride (0.5%), and calcium acetate (0.05%) and then embedded in low-melting point paraffin with polyethylene glycol distearate at 37°C (Sigma-Aldrich). For immunofluorescence tissues were mounted in OCT embedding compound (Sakura Finetek) and frozen tissues were cryosectioned (5 μ m) and sections were fixed for 10 min in acetone. For bone histology analysis, tibia were fixed overnight in 4% PFA, decalcified, embedded in

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Mouse model of WHIM Syndrome

paraffin, cut in 2 μm sections, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Giemsa. BM smears were stained with May-Grünwald-Giemsa.

For immunohistochemistry, fixed axillary lymph node (aLN) and spleen tissues were embedded in low-melting point paraffin. Deparaffinized slides were incubated with Ab against CD45R (B220) (clone RA3-6B2, CliniScience), CD3 (polyclonal, DAKO), MOMA-1 (CD169) (clone 3D6, Abcam), Lyve-1 (polyclonal, AngioBio) or PNA^{Ad} Carbohydrate Epitope (CD62L) (clone MECA-79, BD Biosciences) in 3% PBS-BSA overnight at 4°C. A peroxidase-based system was used for detection.

For immunofluorescence, slides from frozen and acetone-fixed thymus, spleen and aLN tissues were sequentially rehydrated for 10 min in PBS, treated for 1 hour at room temperature with 10% PBS-NGS, and incubated overnight at 4°C with biotin-conjugated rat anti-CD90.2 (Thy1.2) (clone 53-2.1, BD Biosciences), Alexa fluor 488-conjugated rat anti-CD45R/B220 (clone RA3-6B2, BD Biosciences), rat anti-CD8 α (clone 53-6.7, BD Biosciences), or biotin-conjugated rat anti-CD4 (clone RM4-5, Biosciences) mAbs. Slides were then incubated 1 hour at room temperature with secondary Ab goat anti-rat IgG-Alexa Fluor 488 or Alexa fluor 594-conjugated streptavidin (Molecular Probes). After 3 washes in PBS, slides were mounted with Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates). Slides were analyzed with a fluorescence microscope Axio Imager 2 (Carl Zeiss) with an image processing and analysis system Axiovision software (Carl Zeiss).

Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation assays were performed as previously described⁴ with some modifications. Briefly, 10×10^6 HEK cells or spleen- and thymus-derived cells were lysed in 0.2 mL ice-cold lysis buffer (LB; 30 mM HEPES, 100 mM KCl, 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5% glycerol, 2% heptanetriol [Fluka], 0.5% laurylmaltoside, 5 μM GDP, 1 μM microcystin [Sigma-Aldrich], 1 mM orthovanadate, and protease inhibitors [Roche]) for 30 min at 4°C.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

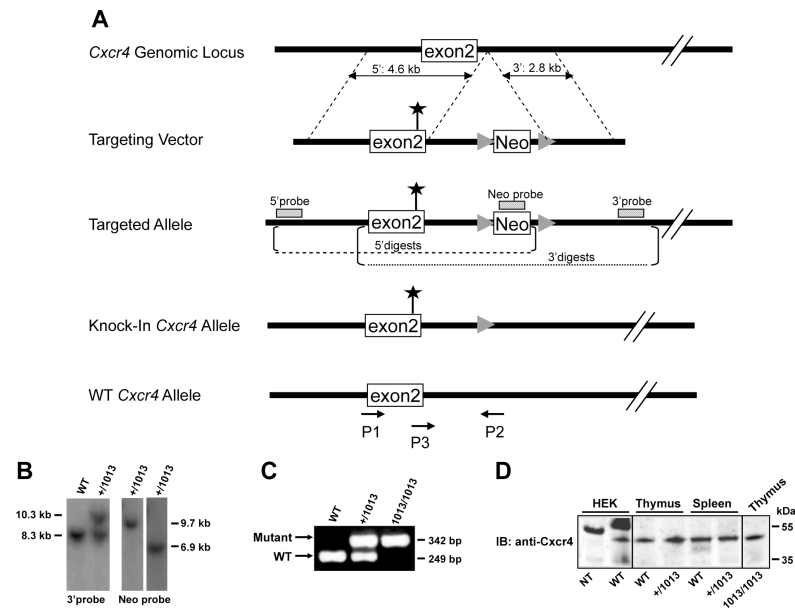
Mouse model of WHIM Syndrome

Precleared lysates were incubated overnight at 4°C with the anti-Cxcr4 mAb 2B11 precoated on γ -bind sepharose beads (GE Healthcare). After 3 washes in the LB, immunoprecipitates were eluted in SDS-PAGE sample buffer (25 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% glycerol, 1.5% SDS, and 0.1% bromophenol blue) for 45 min at 37°C, detected by Western blot analysis using the anti-CXCR4 mAb 2B11, and quantified using a LAS-1000 CCD camera and Image Gauge 3.4 software (both from Fuji Film).

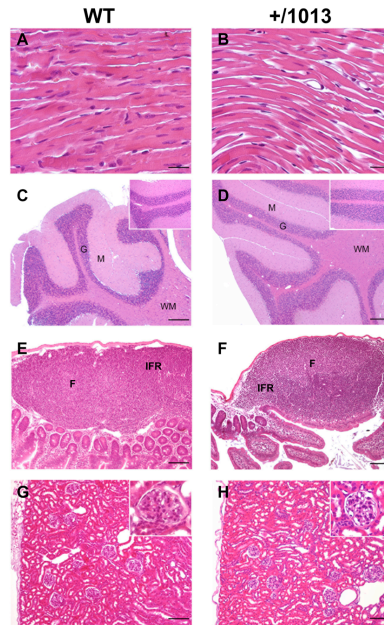
In vivo mobilization

Mice were treated with AMD3100 (5 mg/kg), chalcone 4 (12.4 mg/kg) or PBS via intraperitoneal injection. After 3 hours, the mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg). The peripheral blood was collected by cardiac puncture and the Unopette[®] microcollection system was used for leukocytes quantification. Tibia BM cells were harvested and the total number of leukocytes was determined. Blood and BM leukocytes were pre-incubated with 5 μ g/mL rat anti-mouse CD16/CD32, washed, and then stained with CD19 and Gr1. The samples were analyzed by flow cytometry.

SUPPLEMENTAL FIGURES

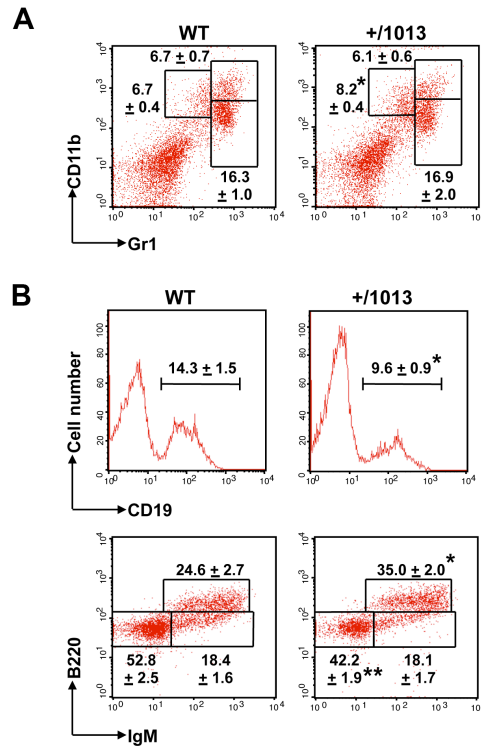


Supplemental Figure 1. Production of *Cxcr4*^{+/₁₀₁₃} mice. (A) Schematic representation of the *Cxcr4* locus, targeting vector, and targeted allele before and after Cre recombination and the WT *Cxcr4* allele (not to scale). Homologous fragments (5' and 3' arms) used in the targeting vector are delineated by dotted lines. Asterisk illustrates the mutation and arrows indicate *loxP* sequences. Probes (5', 3', and Neo) used to screen for the recombination event are indicated as well as the primers designed to distinguish WT and knock-in alleles. (B) Hybridization of the 3'-probe to digested-genomic DNA resulted in bands that corresponded to WT (8.3 kb) and knock-in (10.3 kb) alleles in heterozygous (+/1013) ES cells (left panel). Additional digestions and hybridization of the Neo probe confirmed a correct targeting event (right panel). (C) Genotyping PCR strategy used to screen for WT and knock-in alleles in the mouse mutant line based on the combination of primers P1, P2, and P3. A representative result is provided for the P3 and P2 couple that generated a 249-bp band for the WT animals, two bands (249 and 342 bp) for the +/1013 mice, and a 342 bp band for the homozygous *Cxcr4*^{1013/1013} (1013/1013) animals obtained by intercrossing heterozygous mice. (D) Total lysates of thymi and spleens from WT, +/1013, and 1013/1013 mice were incubated with the 2B11 anti-Cxcr4 mAb precoated on γ -bind sepharose beads. In parallel, lysates from HEK 293T (HEK) cells nontransfected (NT) or transfected with mouse *Cxcr4*^{wt} cDNA (WT) were used as negative and positive controls, respectively. Immunodetection of precipitated receptors using the 2B11 anti-Cxcr4 mAb revealed only one band with an apparent molecular weight close to that expected for Cxcr4⁺ (~42 kDa). The thin vertical line indicates that the lanes were run on the same gel but were noncontiguous. A representative experiment out of 3 independent determinations is shown.



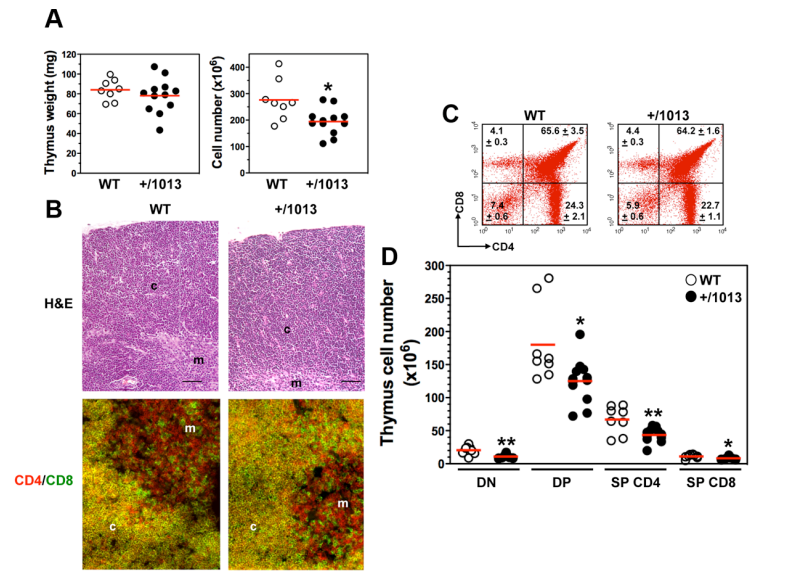
Supplemental Figure 2. Normal organogenesis in *Cxcr4*^{+/1013} mice. (A, B) Myocardium sections harvested from WT (A) and +/1013 (B) mice were stained with hematoxylin and eosin (H&E). No dysplasia of the ventricular septum was observed. (C, D) Cerebellum sections show no abnormal migration of external granule layer cells in +/1013 mice (inset are enlarged granule layer). G, granule cell layer; M, molecular layer; WM, white matter. (E, F) Peyer's patch sections of the small intestine from +/1013 mice display normal follicle morphology. F, follicle; IFR, interfollicular region. (G, H) Kidney sections show no defective glomerulogenesis in +/1013 mice (inset are enlarged glomeruli). Original magnification: $\times 200$ (A, B), $\times 40$ (C–H) and $\times 100$ (insets in C, D, G, H); Scale bars, are 200 and 500 μm , respectively. A representative experiment out of 3 independent ones is shown.

Mouse model of WHIM Syndrome



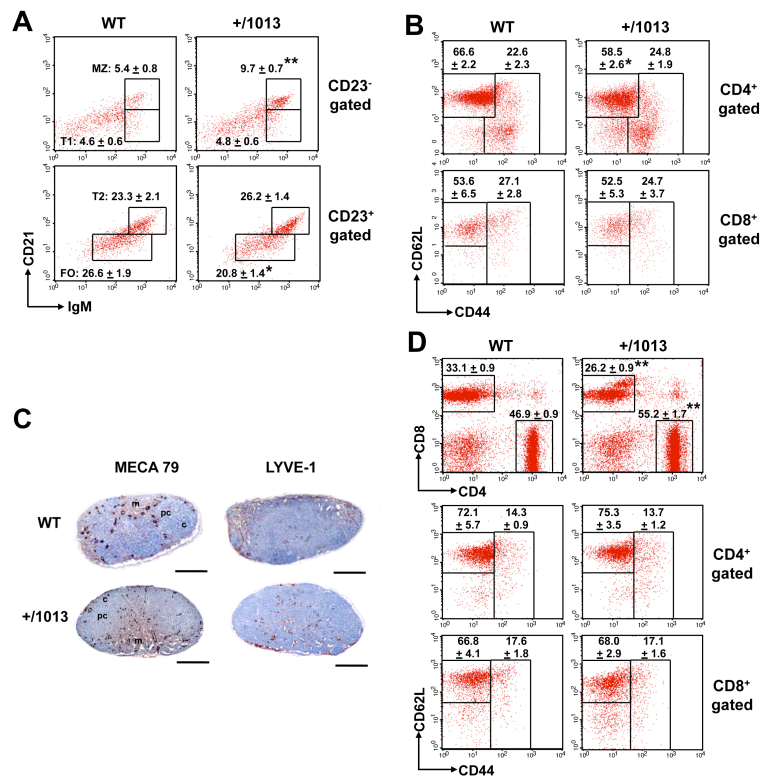
Supplemental Figure 3. BM granulocyte and B-cell compartments in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. BM cells recovered from two femurs were analyzed by flow cytometry. Frequencies (mean ± SD, $n = 6-11$) of (A) promyelocytes/myelocytes (CD11b^{int}Gr1^{int}), metamyelocytes/band forms (CD11b^{low}Gr1^{high}) and mature neutrophils (CD11b^{high}Gr1^{high}), and of (B) total B cells (CD19⁺), pro/pre-B cells (CD19⁺B220⁺IgM⁺), immature (CD19⁺B220⁺IgM⁺), and mature (CD19⁺B220^{high}IgM⁺) B cells are shown. One dot-plot represents one mouse. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ compared with WT mice.

Mouse model of WHIM Syndrome



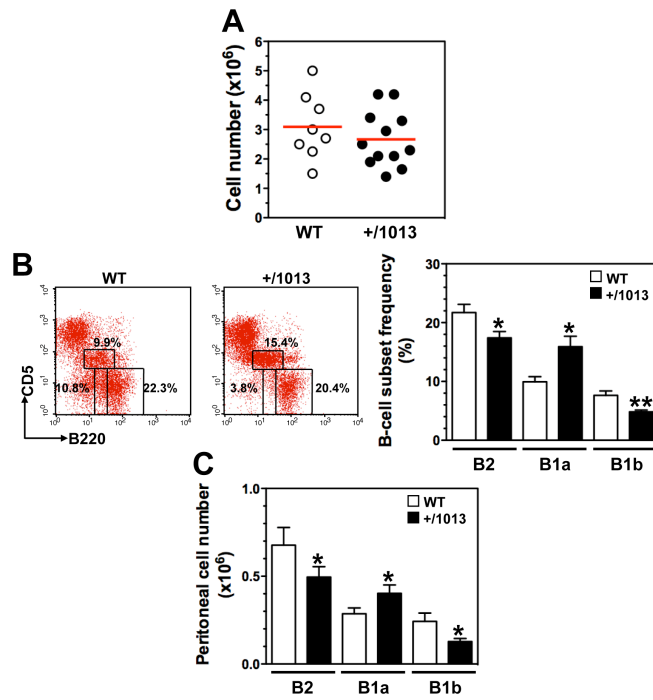
Supplemental Figure 4. Thymocyte development in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. (A) Wet weight of the thymus (left panel) and total thymocyte numbers (right panel) were determined. (B) Thymus sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or immunostained for CD4 (red) and CD8 (green). Medulla (m) and cortex (c) areas are indicated. Original magnification: ×100 (H&E) and ×200 (CD4/CD8); Scale bars are 200 μm. (C, D) CD4 and CD8 expression was analyzed on total thymocytes by flow cytometry. Frequencies (mean ± SD, *n* = 8–12, C) and absolute numbers (D) of double-negative (DN, CD4⁻CD8⁻), double-positive (DP, CD4⁺CD8⁺), and single-positive (SP, CD4⁺CD8⁻ or CD4⁻CD8⁺) thymocyte subpopulations are shown. Results of all the analyzed littermates are displayed (A, D), are from one representative mouse (C), or are representative of 3 independent determinations (B). Lines indicate the mean and each circle indicates an individual mouse (A, D). **P* < 0.05; ***P* < 0.005 compared with WT mice.

Mouse model of WHIM Syndrome



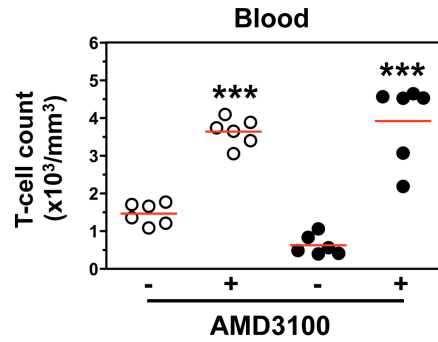
Supplemental Figure 5. T- and B-cell compartments in secondary lymphoid organs of *Cxcr4*^{+/1013} mice. (A, B) Splenocytes were labeled with the indicated mAbs and analyzed by flow cytometry. Frequencies (mean \pm SD, $n = 8-12$) of (A) transitional (T1, CD23⁻CD21^{low}IgM^{high} and T2, CD23⁺CD21^{high}IgM^{high}), follicular (FO, CD23⁺CD21^{int}IgM^{low}), and marginal zone (MZ, CD23⁻CD21^{high}IgM^{high}) B220⁺-gated B cells and of (B) naive (CD44^{low}CD62L^{high}) and effector/memory (CD44^{high}) CD4⁺ or CD8⁺ T cells are shown. (C) Axillary LN sections were immunostained for lymphatic vessels with the Lyve-1 Ab (brown) and for peripheral lymph node addressin (PNAd) with the MECA-79 Ab (brown). Cortex (c), paracortex (pc) and medullary (m) areas are indicated. LYVE-1 staining was distributed just below the capsule and in the medullary region in wt mice LNs, but present in the paracortex of mutant mice LNs. Original magnification: $\times 40$, scale bar, 500 μ m. (D) Axillary LN cells were analyzed for CD4 and CD8 expression, and CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed for CD62L and CD44 expression. Proportions (mean \pm SD, $n = 7-9$) of total, naive, and effector/memory CD4⁺ or CD8⁺ T cells are shown. Similar results were obtained in inguinal LNs. Results are from one representative mouse (A, B, D) or are representative of 3 independent determinations (C). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ compared with WT mice.

Mouse model of WHIM Syndrome



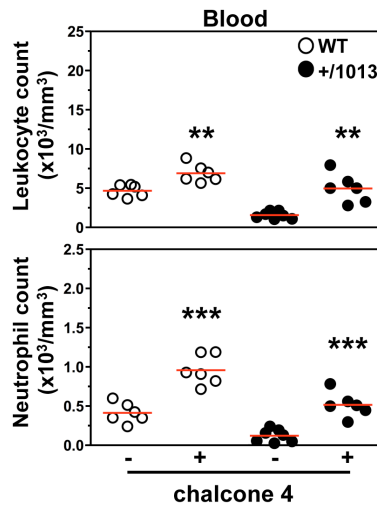
Supplemental Figure 6. Peritoneal B-cell compartmentalization in *Cxcr4*^{+/-1013} mice. (A) Absolute numbers of total peritoneal cells were determined. (B, C) Peritoneal cells were surface stained with anti-B220, -CD11b, -CD5 and -IgM mAbs and analyzed by flow cytometry. Frequencies (mean \pm SD, $n = 7-10$, B) and absolute numbers (mean \pm SD, C) of peritoneal B2 (B220^{high}CD11b⁻CD5⁻IgM^{low}), B1a (B220^{low}CD11b⁺CD5⁻IgM^{high}), and B1b (B220^{low}CD11b⁺CD5⁺IgM^{high}) cells are shown. Results of all analyzed littermates are displayed (A, B, C) with one dot-plot representing one mouse (B, left panels). Lines indicate the mean and each circle indicates an individual mouse (A). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ compared with WT mice.

Mouse model of WHIM Syndrome



Supplemental Figure 7. AMD3100-promoted reversion of T-cell lymphopenia in *Cxcr4*^{+/1013} mice. Absolute numbers of total CD3⁺ T cells were determined in the blood 3 hours after intraperitoneal injection of AMD3100 (+) or PBS (-). Results of all analyzed littermates are shown. Lines indicate the mean and the each circle indicates an individual mouse. ****P* < 0.0005 compared with PBS-treated mice.

Mouse model of WHIM Syndrome



Supplemental Figure 8. Leukopenia is normalized upon chalcone 4-administration to *Cxcr4*^{+/1013} mice. Absolute numbers of total leukocytes and Gr1⁺ neutrophils were determined in the blood 3 hours after intraperitoneal injection of chalcone 4 (+) or PBS (-). Results of all analysed littermates are shown. Lines indicate the mean and the each circle indicates an individual mouse. **P < 0.005; ***P < 0.0005 compared with PBS-treated mice.

REFERENCES

- 1-Gasparik V, Daubeuf F, Hachet-Haas M, et al. Prodrugs of a CXC chemokine-12 (CXCL12) neutraligand prevent inflammatory reactions in an asthma model in vivo. *ACS Med Chem Lett.* 2011. Prepublished on 09 Dec 2011 as DOI DOI: 10.1021/ml200017d.
- 2-Balabanian K, Couderc J, Bouchet-Delbos L, et al. Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J Immunol.* 2003;170(6):3392-3400.
- 3-Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood.* 2005;105(6):2449-2457.
- 4-Lagane B, Chow KY, Balabanian K, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood.* 2008;112(1):34-44.

3- Conclusion et perspectives

Dans cet article, que je signe en co-second auteur, nous décrivons une souche de souris hétérozygote pour une mutation de *Cxcr4* rapportée chez l'humain qui présente, à l'instar des patients, une lympho-neutropénie sévère. La correspondance avec les patients ne s'arrête néanmoins pas là. Notamment, cette souris ne présente pas d'anomalies morphologiques apparentes. A l'image de la comparaison entre patients et témoins (Balabanian *et al.*, 2005b), les leucocytes de cette souris présentent une expression membranaire de *Cxcr4* identique aux souris sauvages. La réponse chimiotactique spécifique exacerbée des lymphocytes induite par *Cxcl12* est aussi retrouvée, accompagnée par le défaut d'internalisation du récepteur après stimulation par *Cxcl12*. Tous ces points suscités font du modèle murin *Cxcr4*^{+/*1013*} un modèle adéquat pour l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans le développement du SW.

Néanmoins, l'étude plus approfondie de cette souris a montré des différences quant à la pathologie humaine. Premièrement, l'absence de virus de type VPH au tropisme murin ne permet pas l'étude des processus d'apparition des verrues ni de leur transformation en condylomes dysplasiques présentés par certains patients (Chow *et al.*, 2010). Deuxièmement, l'hypogammaglobulinémie est absente au profit d'une hypergammaglobulinémie de type G et M qui est en opposition avec les observations courantes (Dotta *et al.*, 2011). Une interrogation émerge de cette observation : celle de savoir dans quelle mesure le processus de production d'Ig est perturbé dans cette souris et notamment celui de la production des PC spécifiques de l'Ag. Cette étude ne permet pas non plus de déterminer si ces souris présentent une susceptibilité accrue aux infections. Enfin, la myelokathexie n'est pas retrouvée dans ces souris. La morphologie pyknotique des PNN se retrouve naturellement chez la souris. L'utilisation de la cytométrie en flux ne s'est pas montrée performante quant à la mise en évidence d'un processus de granulopoïèse altérée, ce qui est dichotomique avec l'observation de l'augmentation de près de 47% du nombre de PNN et de 57% du rapport myéloïde/érythroïde obtenu sur le myélogramme. Ceci suggère que la stricte définition de la myelokathexie sur la base de la morphologie n'est pas adaptée chez la souris.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

En revanche, la caractérisation de la souris *Cxcr4*^{+/-1013} a permis d'identifier des anomalies dans la différenciation des LB et LT, ce qui a été observé jusqu'alors sur un patient (Gulino *et al.*, 2004). La diminution des stades précoces des ontogénies B et T jusqu'aux stades circulants indique que le mécanisme de lymphopénie est dû en partie à un défaut de production des stades immatures (LB) et naïfs (LT). Un fait marquant est la normalisation du nombre des LB matures recirculants dans la MO, site producteur de Cxcl12, qui suggère un tropisme exacerbé vers cet organe ou une prolifération exacerbée de ceux-ci.

La rate présente une hypoplasie qui touche les LB et LT. Ce processus reflète la diminution de la représentation sanguine des lymphocytes, et bien que la pulpe rouge exprime Cxcl12 (Hargreaves *et al.*, 2001), le gain de fonction de Cxcr4 ne semble pas générer d'accumulation splénique des lymphocytes. On ne peut néanmoins exclure un défaut d'entrée, de prolifération, de survie ou de sortie des LB et LT de cet organe.

En revanche, la population LB de la ZM est préservée. Cette population n'est pas décrite comme capable de recirculation dans l'organisme et est résidente de la rate. L'origine de ces LB reste peu comprise et il n'existe pas de consensus sur une origine transitionnelle ou d'une population autonome capable d'auto-renouvellement (Kanayama *et al.*, 2005). Deux possibilités en découlent : l'hyperactivation de Cxcr4 permet soit de favoriser la prolifération et/ou la survie de cette population, soit de moduler la différenciation des LB transitionnels vers le phénotype ZM au détriment du phénotype LB folliculaire. Dans le second cas, une modulation du signal du BCR, nécessaire à la survie des LB de la ZM, pourrait expliquer cela.

Un phénotype marquant touche les GLs, où les LT et LB s'accumulent sans être capables de former des structures ordonnées. L'observation de ces GL montre une conservation des HEV (MECA-79⁺), indiquant une capacité d'entrée conservée, mais une altération du marquage des vaisseaux lymphatiques (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1* - LYVE1⁺), suggérant une altération des systèmes de sortie. Une possibilité simple serait que l'hyperactivation de Cxcr4, jouant à la fois sur les lymphocytes et sur les tissus, altère la formation d'un système de sortie fonctionnel dans les GL, contribuant à l'hypercellularité observée.

Enfin, l'utilisation d'un antagoniste spécifique du RCK (AMD3100) ou du ligand (Chalcone-4), entraîne chez les souris présentant le gain de fonction une hyperleucocytose qui est observée sur les souris sauvages sous traitement. Cette observation démontre le rôle causal du couple Cxcl12-Cxcr4 dans le processus lymphopénique.

En revanche, le traitement par ces antagonistes ne génère pas de diminution médullaire des leucocytes, ce qui reste surprenant lorsque l'on considère le mode d'action décrit de l'AMD3100. Il est envisageable que la mobilisation des leucocytes soit due principalement à une libération des OLS et que la co-administration de G-CSF soit indispensable à la libération des OLP.

De cette étude, de nombreuses questions restent en suspens :

Premièrement, les parts respectives de la diminution de la lymphopoïèse et de la domiciliation périphérique anormale dans le processus lymphopénique ne sont pas clairement définies. Notamment, on peut se demander dans quelle mesure le gain de fonction de Cxcr4 module l'architecture des tissus non-hématopoïétiques et si la lymphopénie résulte d'un défaut environnemental plutôt que d'un comportement anormal du lymphocyte porteur de la mutation hétérozygote.

Deuxièmement, la déstructuration des OLS, et particulièrement l'absence de follicules primaires B des GLs, pose la question de la capacité des GL à produire une réponse immunitaire de type humorale. En effet, la désorganisation des zones T et zones B générée par le gain de fonction de Cxcr4 pourrait prévenir la formation d'un CG et être un obstacle à sa mise en place.

Troisièmement, s'il est possible de les générer, quelles seraient les altérations de l'homéostasie leucocytaire de souris homozygotes pour la mutation *Cxcr4*¹⁰¹³ ? Les cellules de cette souris n'exprimeraient alors que des récepteurs tronqués en domaine C-terminal et, de fait, ne seraient pas capables de promouvoir un signal dépendant des sites de phosphorylation de ce domaine. A ce jour, il n'a pas été décrit de patients porteurs de mutations hétérozygotes de CXCR4. Aussi, la production de ce modèle sera un outil

exclusivement expérimental, qui permettrait l'étude de la biochimie des récepteurs tronqués, excluant une interférence de l'allèle sauvage.

Dans ce travail, nous avons montré que si la granulopoïèse n'était pas altérée, des problèmes importants dans la différenciation lymphocytaires étaient présents. Aussi, nous avons poursuivi nos études, pour vérifier si seuls les lignages lymphocytaires étaient altérés dans la MO, sur la population NK.

II- Rôles de Cxcr4 et S1P5 dans l'homéostasie des lymphocytes NK chez la souris

1- Rationnel

Cxcl12 et le *sphingosine 1 phosphate* (S1P) sont supposés être respectivement des médiateurs de la rétention ou de la sortie des lymphocytes (Bernardini *et al.*, 2008; Walzer *et al.*, 2007). Les lymphocytes NK sont des cellules de l'immunité innée impliquées dans le contrôle des infections par les virus, bactéries et parasites (Vivier *et al.*, 2008).

Les patients WHIM présentent des verrues cutanées dues à une susceptibilité accrue à l'infection par le VPH. En vertu de cela, il est postulé que la lymphopénie NK rapportée chez certains patients (Dotta *et al.*, 2011) puisse être une cause de sémiologie. Pour comprendre l'origine de cette lymphopénie, et dans le but de décrire un paradigme thérapeutique, nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la circulation des NK.

D'une part, S1P5, un des récepteurs au S1P, est impliqué dans la distribution des NK dans le sang, les organes lymphoïdes, le foie et le poumon (Walzer *et al.*, 2007). Son expression est augmentée durant la maturation des NK et il a été montré que le stade le plus mature des NK est sévèrement affecté par une invalidation de ce récepteur et montre une capacité réduite à sortir de la MO vers le sang.

D'autre part, l'utilisation d'AMD3100 augmente la représentation des NK dans le sang et la rate (Bernardini *et al.*, 2008). Cette augmentation a été attribuée à une libération médullaire de ces cellules.

Ces données montrent que les récepteurs Cxcr4 et S1P5 régulent le trafic des NK dans le sang ; elles suggèrent également qu'ils régulent la sortie de la MO via des mécanismes différents (*i.e.* rétention dépendante de Cxcl12 et sortie dépendante de S1P).

Pour cela, nous avons postulé l'existence de plusieurs modes d'actions possibles :

- La désensibilisation de CXCR4 dans la MO est due à la concentration de CXCL12 et l'engagement de S1P5 est un signal de sortie ;
- CXCR4 n'est pas désensibilisé mais S1P5 est capable de générer un signal pouvant surmonter l'effet de CXCL12 sur la rétention promue par CXCR4 ;
- L'engagement de S1P5 par S1P favorise une désensibilisation hétérologue de CXCR4.

Dans ce projet collaboratif, nous avons utilisé deux modèles de souris (*Cxcr4*⁺¹⁰¹³ et *S1PR5*^{-/-}) pour déterminer les modes d'action possibles de Cxcr4 et S1P5. Pour cela, nous avons mis à profit de nouvelles techniques de marquage des systèmes de sortie de la MO et des GL couplées au phénotypage par cytométrie en flux et immunofluorescence. Nous avons de plus caractérisé la fonction des NK par des tests de chimiotaxie (Cxcl12 et S1P) et d'internalisation de Cxcr4. Nous avons pu ainsi mettre en évidence la contribution des signaux promus par les deux récepteurs et leur mode d'action.

2- Exposé des travaux

Article n°2 : « Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking » (Blood, 2011)

Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking

Katia Mayol,¹⁻³ Vincent Biajoux,^{4,5} Jacqueline Marvel,¹⁻³ Karl Balabanian,^{4,5} and Thierry Walzer¹⁻³

¹Université de Lyon, Lyon, France; ²Inserm U851, Lyon, France; ³Université de Lyon, UMS3444/US8, Lyon, France; ⁴Université Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chemokines and Immunopathology," Clamart, France; and ⁵Inserm, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart, France

During development, natural killer (NK) cells exit the BM to reach the blood. CXCR4 retains NK cells in the BM, whereas the sphingosine-1 phosphate receptor 5 (S1P5) promotes their exit from this organ. However, how the action of these receptors is coordinated to preserve NK-cell development in the BM parenchyma while providing mature NK cells at the periphery is unclear. The role of CXCR4 and S1P5 in NK-cell recirculation at the periphery is also unknown. In the

present study, we show that, during NK-cell differentiation, CXCR4 expression decreases whereas S1P5 expression increases, thus favoring the exit of mature NK cells via BM sinusoids. Using S1P5^{-/-} mice and a new knockin mouse model in which CXCR4 cannot be desensitized (a mouse model of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis [WHIM] syndrome), we demonstrate that NK-cell exit from the BM requires both CXCR4 desensitization and

S1P5 engagement. These 2 signals occur independently of each other: CXCR4 desensitization is not induced by S1P5 engagement and vice versa. Once in the blood, the S1P concentration increases and S1P5 responsiveness decreases. This responsiveness is recovered in the lymph nodes to allow NK-cell exit via lymphatics in a CXCR4-independent manner. Therefore, coordinated changes in CXCR4 and S1P5 responsiveness govern NK-cell trafficking. (*Blood*. 2011;118(18):4863-4871)

Introduction

Natural killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immune system that are involved in the early control of infections by viruses and intracellular bacteria or parasites.¹ They can kill cells recognized as targets through a battery of surface receptors² and also produce large amounts of cytokines such as IFN- γ upon activation.¹ Several NK-cell subsets have been described on the basis of surface expression of the TNF superfamily member CD27 and the integrin CD11b: CD11b^{low}CD27^{low} (hereafter called double negative or "DN"), CD11b^{low}CD27^{high} NK cells ("CD11b^{low}"), CD11b^{high}CD27^{high} (double positive or "DP"), and CD11b^{high}CD27^{low} ("CD27^{low}").^{3,4} We previously found that NK-cell maturation is a 4-stage process that starts at the DN stage and follows the pathway DN \rightarrow CD11b^{low} \rightarrow DP \rightarrow CD27^{low}.³ DN NK cells are very rare and immature and could arguably correspond to precursors. All 3 other subsets are quite abundant in lymphoid organs, but their distribution is very different: CD11b^{low} NK cells are mostly located within the BM and lymph nodes (LNs); CD27^{low} NK cells are mostly found in the blood, the spleen, and nonlymphoid organs such as liver and lung; and DP NK cells are more evenly distributed in these organs.⁵ NK cells develop mainly in the BM. Like other lymphocytes, they are thought to reach the blood circulation via venous sinusoids.⁶ Once in the periphery, they can also enter the LNs through a CD62L-dependent process.⁷ Exit from the LNs presumably occurs via medullar sinusoids that connect to efferent lymphatics.⁶ The chemotactic receptors that control the differential distribution of NK-cell subsets are poorly defined but could involve sphingosine-1 phosphate receptor 5 (S1P5) and CXCR4.

We found previously that S1P5, 1 of the 5 receptors used for the chemoattracting lipid S1P, was involved in the trafficking of

NK cells among the blood, lymphoid organs (eg, spleen), and peripheral tissues such as liver and lung.⁵ S1P5 expression is progressively up-regulated during NK-cell maturation.⁵ Accordingly, we found that the release of CD27^{low} NK cells to the blood was altered more by S1P5 deficiency compared with the other subsets.⁵ S1P5 is closely related to S1P1, another S1P receptor expressed by T and B cells that promotes egress of these cells from lymphoid organs.^{6,8,9} Based on this similarity, the expression pattern of S1P5, and the phenotype of S1P5-deficient mice, we hypothesized that S1P5 was involved in the egress of NK cells from lymphoid organs. A recent study by Jenne et al confirmed this hypothesis by comparing NK cells present in the thoracic duct of wild-type (WT) and S1P5-deficient mice.¹⁰ However, among other open questions, it is still unclear which NK cells are affected by S1P5 deficiency, whether S1P5 is important for exit from both the BM and LNs, and, if so, what is the precise mechanism by which S1P5 promotes NK-cell exit with respect to other receptors regulating this process.

The administration of AMD3100, a selective CXCR4 antagonist, to mice has been shown to increase the number of blood and spleen NK cells, presumably by recruiting them from the BM.¹¹ Other NK-cell reservoirs could also be involved, because CXCL12, the CXCR4 ligand, is expressed in peripheral organs such as the LNs.¹² This initial study suggested that CXCR4-mediated retention has to be overcome for NK cells to exit BM,¹¹ and therefore opened the possibility that CXCR4 and S1P5 regulate NK-cell exit from the BM in opposite directions (ie, retention in the BM vs exit to the blood). Several nonmutually exclusive models can be considered

Submitted June 21, 2011; accepted August 30, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 12, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-06-362574.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

The online version of this article contains a data supplement.

© 2011 by The American Society of Hematology

for the molecular control of NK-cell exit: (1) CXCR4 desensitization occurs in the BM because of high local concentrations of CXCL12 and another exit signal is provided by SIP5 engagement; (2) CXCR4 is not desensitized but SIP5 transduces unique signals that overcome CXCL12/CXCR4-dependent signaling to promote exit; and (3) SIP5 engagement by SIP induces heterologous desensitization of CXCR4 to promote NK-cell exit. Heterologous desensitization of G protein–coupled receptors has been described in various settings.¹³ In the present study, we set up several experimental models to discriminate between these possibilities. We demonstrate that NK-cell exit from the BM requires 2 signals, CXCR4 desensitization and SIP5 engagement. These events are coordinated but not dependent on each other. Indeed, SIP5 engagement had no effect on CXCR4 responsiveness and vice versa. The egress capacity of NK cells increased with the maturation status in both the BM and LNs. CD27^{low} NK cells were more affected by SIP5 deficiency than the other subsets. Reciprocally, immature NK cells were more efficiently retained by CXCR4 in the BM. Our results support a model in which CXCR4 and SIP5 responsiveness are cyclically modulated during NK-cell trafficking and maturation to promote exit from the BM or entry into lymphoid organs.

Methods

Mice and reagents

C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories. SIP5^{-/-} mice (12 generations backcrossed to C57BL/6) have been described previously¹⁴ and were bred in our pathogen-free breeding facility. The generation of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice has been described elsewhere (K.B., E. Brotin, V.B., L. Bouchet-Delbos, E. Lainey, O. Fenneteau, L. Fiette, D. Emilie, and F. Bachelerie, unpublished data, June 2011). Briefly, heterozygous mice were engineered following a gene knockin strategy: the homologous recombination of a mouse mutated *Cxcr4* gene (CT > GA) reproducing the *CXCR4*¹⁰¹³ mutation we described in a warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis (WHIM) syndrome (WS) pedigree,¹⁵ which leads to the truncation of the last 15 residues of the C-tail domain. Generated *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice were backcrossed for > 10 generations to a C57BL/6J background (> 98%). All mice used in this study were between 6 and 10 weeks old. AMD3100 (Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally (150 μg/mouse). Experimental procedures and mice housing were approved by the Inserm Ethics Committee for Animals and carried out according to French and European laws.

In vivo labeling of sinusoidal lymphocytes

Sinusoidal lymphocytes were labeled using a procedure described previously.^{16,17} Mice were injected intravenously with 1 μg of anti-CD45 mAb coupled to PE (BD Biosciences). Mice were killed 2 minutes after Ab injection and the different organs were harvested.

Immunofluorescence

Immunofluorescence was carried out on 10-μm-thick serial frozen sections. Sections were fixed with acetone and stained with anti-LYVE1 (rat monoclonal; R&D Systems) and anti-NKp46 (goat Ab; R&D Systems) Abs, followed by staining with the appropriate Alexa Fluor 488– and Alexa Fluor 647–coupled secondary Abs (Invitrogen). Slides were analyzed by confocal microscopy (LSM 510; Zeiss) using a 40× objective at room temperature.

Abs and flow cytometry

BM, LNs, spleen, and blood cells were isolated and stained as described previously.⁵ The following mAbs from eBioscience were used: anti-CD27 (LG.3A10), anti-CD3 (2C11), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD11b (MI/70),

anti-CXCR4 (2B11), and relevant isotype controls. Flow cytometry was carried out on a FACSCanto or FACS LSR II analyzer (BD Biosciences).

Chemotaxis assays

Spleen, BM, or blood cells were suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 4 mg/mL of fatty acid-free bovine albumin (Sigma-Aldrich). The same medium was used to prepare SIP (Sigma-Aldrich) at 10⁻⁸M or CCL5 at 50 ng/mL (R&D Systems) or CXCL12 at 50 ng/mL (kindly provided by Dr F. Baleux, Institut Pasteur) unless otherwise specified. Cell migration was analyzed in Transwell chambers (Costar) with 5-μm pore-width polycarbonate filters. Transmigrated cells were stained for CD3, NK1.1, CD27, and CD11b and counted by flow cytometry as described previously.⁵ In some experiments, BM cells were cultured at 5 × 10⁶ cells/mL for 2 hours in RPMI 1640 medium supplemented with 4 mg/mL of fatty acid-free bovine albumin in the absence or presence of either CXCL12 (50 ng/mL) or SIP (10⁻⁸M), before the migration assay.

Internalization assays

CXCR4 internalization was studied as described previously¹⁵ with some minor modifications. Briefly, 1 × 10⁶ BM cells were incubated at 37°C for 45 minutes with various concentrations of CXCL12. After one wash in acidic glycine buffer (pH = 4.3), levels of CXCR4 cell-surface expression were determined using the PE-conjugated 2B11 mAb in combination with fluorescent mAbs specific for CD3, CD11b, CD27, and NK1.1 antigens to delineate NK-cell subsets. Background fluorescence was evaluated using the corresponding PE-conjugated, Ig-isotype control Ab. No receptor internalization was found when BM cells were incubated at 4°C in the presence of 250nM CXCL12. CXCR4 expression in stimulated cells was calculated as follows: (CXCR4 geometric MFI of treated cells/CXCR4 geometric MFI of unstimulated cells) × 100; 100% correspond to receptor expression at the surface of cells incubated in medium alone.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using 2-tailed *t* tests run on Excel Version 12.3.1 (Microsoft) or Prism Version 5 (GraphPad) software. Levels of significance are expressed as follows: **P* < .05; ***P* < .01; and ****P* < .001.

Results

In vivo analysis of NK-cell exit from BM and LNs

Lymphocytes exit central and peripheral lymphoid organs through sinusoids that connect either to the blood circulation (for BM) or to efferent lymphatics (for LNs).⁶ To study the exit of NK cells from lymphoid organs, we used a recently described procedure that allows the discrimination of parenchymal and sinusoidal cells in the BM.^{16,17} In this procedure, IV injection of anti-CD45 Ab labels circulating cells, including BM sinusoidal cells. Mice are rapidly killed before the Ab can diffuse to the parenchyma of lymphoid organs. As shown in Figure 1A, a significant number of BM NK cells were labeled after anti-CD45 injection. We also observed that a similar fraction of NK cells was labeled in the LNs (Figure 1A), suggesting that the anti-CD45 Ab also stained lymphocytes in the process of leaving the LNs. Lymphocyte egress from LNs is thought to occur at the medullary sinuses that connect to the efferent lymphatics. Moreover, lymphocytes can initiate exit from the LNs via cortical sinuses present at the border between T- and B-cell areas that will eventually lead them to the medullary sinuses.¹⁸ Both medullary and cortical sinuses are positive for the lymphatic endothelial cell marker LYVE-1.¹⁸ To identify the LN compartment labeled with the anti-CD45 Ab during the in vivo procedure, we stained LN sections from anti-CD45–treated mice for LYVE-1 and NKp46 (a NK-cell marker) expression. As shown

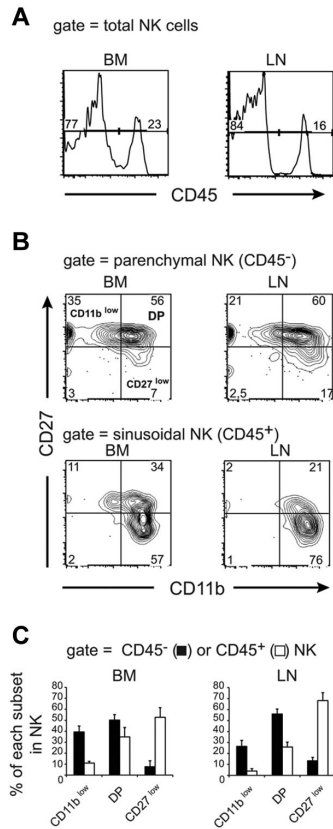


Figure 1. Phenotypic analysis of parenchymal and sinusoidal NK cells. Flow cytometric analysis of BM and LN NK cells isolated from WT mice injected with anti-CD45 and then stained *in vitro* with Abs for CD3, NK1.1, CD27, and CD11b. Numbers above bracketed lines or in quadrants indicate the percentage of cells in each area. (A) CD45 labeling of gated NK cells (NK1.1⁺ CD3⁻). (B-C) Analysis of CD45 staining in NK-cell subsets defined by CD27 and CD11b expression. (B) Representative FACS plot of CD27/CD11b expression in gated CD45⁻ (top panels) and CD45⁺ (bottom panels) NK cells. (C) Mean \pm SD percentage of CD45⁻ (parenchymal, black bars) and CD45⁺ (sinusoidal, white bars) cells among CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} NK cells calculated from the analysis of 10 mice.

in supplemental Figure 1A (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article), most anti-CD45-labeled cells are present in the LYVE-1 positive medullar region of the LNs in the same area as NK cells. Moreover, many of the anti-CD45-stained cells are located within vessel-like structures that could correspond to efferent lymphatics (white arrows on supplemental Figure 1A-B). In these structures, NK cells doubly stained with anti-CD45 and anti-NKp46 are visible (supplemental Figure 1B). We also observed that some anti-CD45-labeled cells were present in the T-cell cortex around LYVE-1-positive structures that are likely cortical sinuses (supplemental Figure 1A,C). These results show that IV-injected anti-CD45 Ab mainly labels lymphocytes exiting LN via medullar and cortical sinuses, allowing us to analyze NK-cell exit from both the BM and LNs using this technique.

We analyzed the CD11b/CD27 phenotype of sinusoidal versus parenchymal NK cells. As described previously^{3,4} and as depicted in Figure 1B, the 4 NK-cell subsets could be discriminated based on CD11b/CD27 surface levels. We focused our attention on the 3 main subsets, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} NK cells, as defined at

top left panel in Figure 1B. We observed that sinusoidal NK cells were strongly enriched for the CD27^{low} subset compared with parenchymal NK cells in both organs (Figure 1B-C), indicating that CD27^{low} NK cells had an improved capacity to exit lymphoid organs. These findings are consistent with our previous data⁵ showing that only CD27^{low} NK cells are capable of responding efficiently to S1P, an exit signal for lymphocytes. Interestingly, a significant number of CD11b^{low} NK cells was capable of exiting the BM, suggesting that immature NK cells can complete their maturation program in the periphery.

S1P5 is more important for mature NK-cell exit from the LNs than from the BM

To address the role of S1P5 in NK-cell exit from the BM and LNs, we compared the percentage of sinusoidal NK cells in the BM and LNs of WT and S1P5^{-/-} mice. We observed a decreased percentage of CD45⁺ cells (ie, sinusoidal) among NK cells in S1P5^{-/-} mice for both BM and LNs (Figure 2A). The percentage of CD45⁺ NK cells was close to zero in S1P5^{-/-} LNs, showing that S1P5 is likely more important for NK-cell exit from the LNs than for their exit from the BM. All NK-cell subsets were affected in their egress capacity by S1P5 mutation (Figure 2B). However, the dependency on S1P5 increased with NK-cell maturation, which we showed previously was correlated with the level of S1P5 expression.⁵ This was particularly true for CD27^{low} NK cells, which were almost undetectable in the LN sinusoids of S1P5^{-/-} mice. The role of S1P5 was NK specific, because no significant difference was observed between WT and S1P5^{-/-} mice in the percentage of sinusoidal B or T cells either in the BM or the LNs (Figure 2C).

These results confirm the role of S1P5 in NK-cell egress from lymphoid organs and further demonstrate that: (1) S1P5 is more important for the egress of mature NK cells and (2) S1P5 is more important for NK-cell egress from the LNs than it is for their egress from the BM.

CXCR4 strongly retains immature NK cells in the BM

We next sought to investigate the role of CXCR4 in the regulation of NK-cell exit from the BM and LNs. Previous reports showed that all NK cells responded to CXCL12 and that CXCR4 was involved in NK-cell retention in the BM.^{4,11} CXCL12 is also expressed in LN parenchyma¹² and could thus potentially mediate NK-cell retention. We first compared the surface level of CXCR4 in BM NK-cell subsets. Results in Figure 3A show that the level of CXCR4 was lower on CD27^{low} NK cells than on the other NK-cell subsets, whereas DP NK cells displayed an intermediate level. Similar results were obtained for NK cells from other organs (ie, spleen and blood; supplemental Figure 2). To determine whether this difference in CXCR4 level was functionally relevant, we next measured the *ex vivo* chemotactic response of NK-cell subsets to graded doses of CXCL12. As shown in Figure 3B, CD11b^{low} NK cells displayed increased migratory responses at all concentrations tested relative to the other NK-cell subsets, indicating a higher efficiency of chemotaxis to CXCL12. These findings are consistent with the increased cell-surface expression of CXCR4 observed on these cells. DP NK cells tended to respond better than CD27^{low} NK cells. Therefore, responsiveness to CXCL12 is inversely correlated with NK-cell maturation.

To investigate the *in vivo* role of CXCR4 in the retention of NK-cell subsets in the BM and LN parenchymas, we used the selective CXCR4 inhibitor AMD3100.¹⁹ We treated mice with 150 μ g of AMD3100 and compared the number of NK cells of each

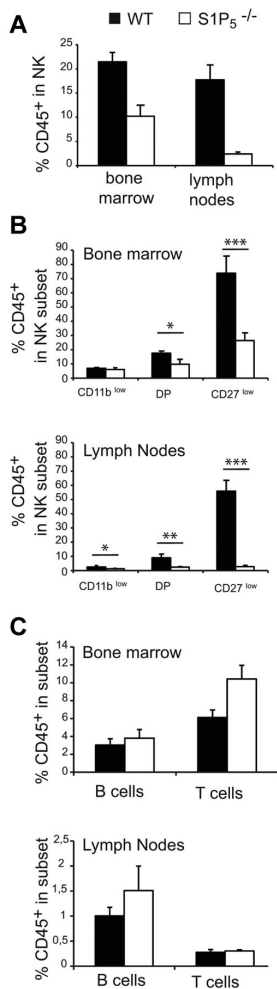


Figure 2. S1P5 is required for NK-cell trafficking to BM and LN sinusoids. Flow cytometry analysis of BM and LN NK cells isolated from WT and S1P5^{-/-} mice injected with anti-CD45 and then stained *in vitro* with Abs for CD19, CD3, NK1.1, CD27, and CD11b. The percentage of CD45⁺ cells among gated NK cells (A), NK-cell subsets (B), or B and T cells (C) was measured in WT (black bars) and S1P5^{-/-} mice (white bars). Data show the mean \pm SD of 5–10 mice in each group.

subset in the different compartments 1 hour after treatment. AMD3100 treatment induced the recruitment of BM parenchymal NK cells to the sinusoids (Figure 4A) and the blood (Figure 4B). No change was observed for total NK cells in LN sinusoids (Figure 4A). When we looked at the CD11b/CD27 phenotype of NK cells in BM and LN sinusoids and in the blood (Figure 4C), we observed that AMD3100 changed the representation of NK-cell subsets so that the percentage of immature NK cells increased in all of these compartments. The effect of AMD3100 was the most pronounced on CD11b^{low} NK cells in the BM, and to a lesser extent in the LNs. DP NK cells were only affected in BM sinusoids and in the blood, whereas CD27^{low} NK cells were not significantly modified by AMD3100 treatment (Figure 4C–D).

These data show that, in BM, CXCR4-induced retention of NK cells decreases on maturation, which presumably favors S1P5 responsiveness and thus the exit of more mature NK cells. In the

LNs, only the most immature NK-cell subset is affected by inhibition of CXCR4 signaling.

CXCR4 desensitization is required for NK-cell exit from the BM but not the LNs

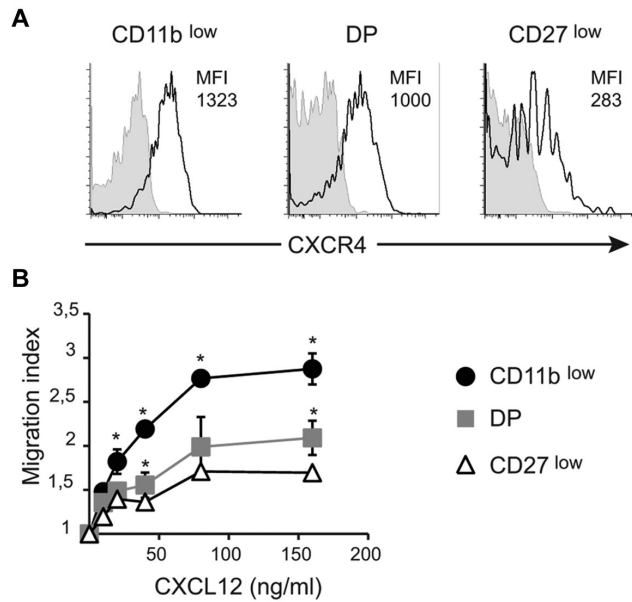
Experiments using AMD3100 showed that CXCR4 retained NK cells in the BM parenchyma. We next sought to understand how NK cells alleviated this retention to leave the BM. We hypothesized that for NK cells to exit the BM, CXCR4 had to be inactivated—that is, uncoupled from G proteins (or desensitized) and internalized. To test this hypothesis, we used a new mouse model in which CXCR4 desensitization is impaired. Heterozygous *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice were generated following a gene knockin strategy and harbor the *CXCR4*^{I1013} punctual mutation we described previously in a WS pedigree.¹⁵ WS is a rare combined immunodeficiency disorder characterized by disseminated HPV infection-induced warts, hypogammaglobulinemia, recurrent bacterial infections, and myelokathexis. Many cases have been linked to inherited heterozygous autosomal-dominant mutations in *CXCR4* that result in distal truncations of the receptor's C-tail.²⁰ In WS patient leukocytes, truncated CXCR4 displays an enhanced and sustained activation of G proteins upon CXCL12 stimulation, which is associated with its inability to be both desensitized and internalized and is not a result of increased CXCR4 expression at the membrane. In keeping with this, membrane expression levels of CXCR4 were found to be in the same range between BM NK cells from *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} and WT mice (supplemental Figure 3A). However, *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} NK cells displayed an increased migration to CXCL12 gradients at all doses tested and irrespective of the NK-cell subset (supplemental Figure 3B–C). Such enhanced responsiveness of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} NK cells to CXCL12 was associated with an impairment of CXCR4 to be internalized after CXCL12 stimulation (supplemental Figure 3D–E). Therefore, knockin *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice recapitulate the pattern of CXCR4 dysfunctions observed in WS patients.

We compared the distribution of NK cells in WT and *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice, and detected an increased frequency of NK cells among lymphocytes in both the BM and LNs of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice (Figure 5A–B). Moreover, the number of NK cells was also increased in these organs, whereas it was strongly reduced in the blood and spleen (Figure 5C). The fraction of sinusoidal CD45⁺ NK cells was also significantly reduced in the BM of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice, but it was preserved in the LNs (Figure 5D). These results indicate that CXCR4 desensitization is required for NK-cell exit from the BM but not from the LNs. Focusing on NK-cell subsets, we found that CD11b^{low} and DP NK cells accumulated in the BM, whereas CD27^{low} NK cells were not affected (Figure 6A). Accordingly, the sinusoidal fraction of CD11b^{low} and DP NK cells was strongly reduced and that of CD27^{low} NK cells was less affected (Figure 6B). In the blood, the number of all NK-cell subsets was reduced, including CD27^{low} NK cells (Figure 6A). These results show that CXCR4 desensitization was required for the exit from the BM of all NK-cell subsets, but particularly for the most immature ones. In the LNs, CXCR4 appears to be dispensable for NK-cell trafficking.

No cross-inhibition between S1P5 and CXCR4 during NK-cell exit from the BM

Our results show that CXCR4 and S1P5 have opposite activities in NK cells, promoting either retention or exit from the BM, and that CXCR4 needs to be desensitized to allow egress. We therefore investigated whether one of the effects of S1P5 engagement was to desensitize CXCR4 in a heterologous manner. To address this

Figure 3. CXCR4 surface level and responsiveness to CXCL12 decrease during NK-cell maturation. (A) BM cells were stained for NK1.1, CD3, CD27, CD11b, and CXCR4 or isotype control. Expression of CXCR4 (black line) or isotype (gray histogram) by gated NK-cell subsets is shown, as indicated. Numbers above histograms indicate mean fluorescence intensity (MFI) of CXCR4 staining minus MFI of isotype control. Data show representative results of 3 independent experiments. (B) Transwell assay of the migration of NK-cell subsets assessing movement toward different concentrations of CXCL12, as indicated. The migration index is calculated as the ratio between the number of cells migrating in the chemokine and in the control (without chemokine) condition. Data are the mean \pm SD of 3 independent experiments with duplicates.



question, we performed a series of complementary experiments. First, we compared the capacity of WT and S1P5^{-/-} BM NK cells to migrate in response to CXCL12 gradients, reasoning that if S1P5 inhibited CXCR4 response, this response should be increased in S1P5^{-/-} mice. However, as shown in Figure 7A, WT and S1P5^{-/-} NK cells displayed similar migration to CXCL12. Reciprocally, we compared the capacity of BM NK cells from WT and *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice to migrate toward S1P gradients, and our results showed no difference in migration (Figure 7B). No difference in the S1P-promoted chemotaxis of WT NK cells isolated from control or AMD3100-treated mice was detected either (supplemental Figure 4). We then pre-incubated WT NK cells with either S1P or CXCL12 at doses that would induce maximal NK-cell migration in vitro for 2 hours before measuring S1P- or CXCL12-induced migration. Figure 7C shows that S1P and CXCL12 induced homologous desensitization of their cognate receptors S1P5 and CXCR4, but did not induce heterologous desensitization (ie, S1P on CXCR4 and CXCL12 on S1P5). Therefore, CXCR4 engagement has no effect on S1P5 response and vice versa, indicating that CXCR4 and S1P5 act in a competitive but not cross-inhibitory manner in vivo.

Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 during NK-cell trafficking

Mature NK cells have been shown to recirculate to the BM when intravenously injected,²¹ suggesting that they could reacquire responsiveness to CXCL12 after leaving the BM. Therefore, we compared the responsiveness of NK cells to S1P and CXCL12 in different compartments (ie, peripheral blood, BM, and spleen). Figure 7D-E shows that the responsiveness of NK cells to CXCL12 and S1P was inversely correlated across lymphoid organs. In particular, NK-cell responsiveness to CXCL12 was higher in the blood, whereas S1P responsiveness was higher in the BM and the spleen but almost null in the blood. Therefore, S1P5 and CXCR4 responsiveness in NK cells is inversely correlated with the concentrations of their respective ligands, S1P and CXCL1, which are known to be high in the blood²² and in the BM,²³ respectively. In comparison, responsiveness to CCL5, a pro-inflammatory chemo-

kine not expressed under steady-state conditions, did not vary significantly among the spleen, BM, and blood (Figure 7F). These results show that, during NK-cell trafficking, CXCR4 and S1P5 are sequentially desensitized. The transient decrease in responsiveness to CXCL12 may favor response to S1P and NK-cell exit from the BM. Reciprocally, during recirculation in the blood, NK-cell entry to BM may be favored by a transient decreased responsiveness to S1P together with an increased sensitivity to CXCL12.

Discussion

In the present study, we combined in vivo labeling of circulating lymphocytes with relevant mouse models to investigate the molecular mechanisms involved in NK-cell exit from lymphoid organs. We demonstrated that: (1) NK-cell exit from the BM requires 2 signals, CXCR4 desensitization and S1P5 engagement; (2) CXCR4 desensitization is not induced by S1P5 engagement and reciprocally—rather, we propose that both S1P5 and CXCR4 are sequentially desensitized by their cognate ligands to promote NK-cell trafficking; (3) coordinated changes in CXCR4 and S1P5 expression favor the exit of mature NK cells from the BM to the periphery; and (4) NK-cell exit from the LNs is not regulated by CXCR4 but is completely dependent on S1P5 engagement.

We used in vivo labeling of circulating cells to study NK-cell exit. This procedure was originally described to study lymphocyte exit from the BM¹⁶ and more recently from the thymus.¹⁷ However, several lines of evidence showed that the injected anti-CD45 mAb also labels lymphocytes exiting the LNs. First, the percentage of lymphocytes labeled in the BM and LNs was comparable. Second, the composition of this labeled fraction was very similar in both organs. In particular, in both organs, CD45 staining was restricted to the most mature NK cells. Third, very few NK cells were CD45⁺ in the LNs of S1P5^{-/-} mice, which fits very well with previous results showing that S1P5^{-/-} NK cells had a defective capacity to reach the thoracic duct.¹⁰ Fourth, visualization of CD45⁺ cells on LN sections showed that most of them are contained within

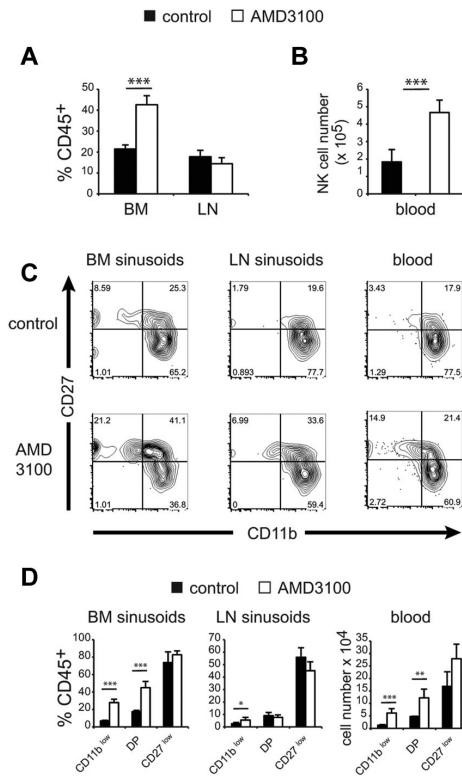


Figure 4. CXCR4 inhibition recruits immature NK cells in BM sinusoids and the peripheral blood. Flow cytometric analysis of BM, LNs, and blood NK cells in WT mice treated for 1 hour with saline (control) or AMD3100 and injected intravenously with PE-conjugated anti-CD45 mAb for the final 2 minutes. (A) Mean \pm SD percentage of CD45⁺ cells in gated NK cells in each group, as indicated. (B) Mean \pm SD number of NK cells among PBMC (for 1 mL of blood) in each group, as indicated (n = 5 mice in each group). (C) Representative FACS plot of CD27/CD11b expression in gated CD45⁺ (sinusoidal) NK cells from BM and LNs and in gated blood NK cells in mice of each group, as indicated. (D) Mean \pm SD percentage of CD45⁺ sinusoidal cells within each NK-cell subset and in mice of each group, as indicated (n = 5 mice in each group).

lymphatic LYVE-1⁺ structures corresponding to cortical or medullary sinuses. Therefore, although we cannot rule out that CD45⁺ LN cells also include a few cells entering the LNs via the blood or afferent lymph, our data suggest that most CD45⁺ LN cells are lymphocytes exiting the LNs via lymphatic sinuses.

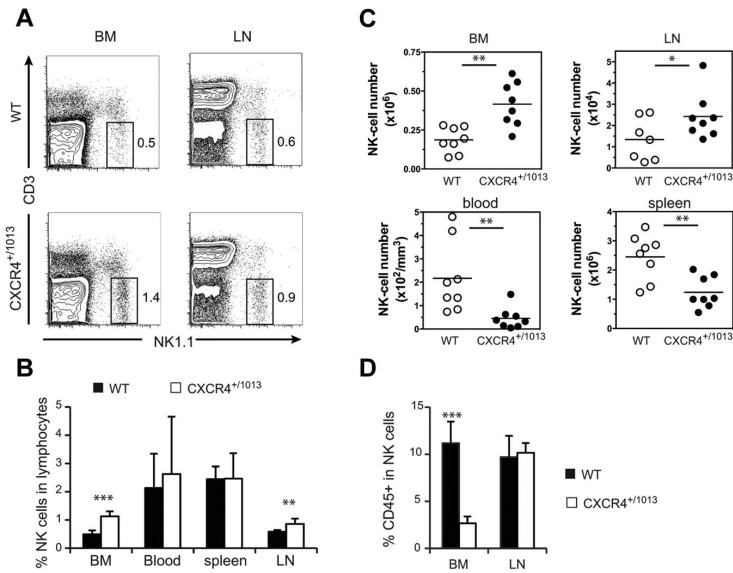
Mature CD27^{low} NK cells have an increased capacity to exit lymphoid organs (Figure 1). In fact, almost all CD27^{low} NK cells are found in the circulation or in sinusoids about to enter the blood circulation. This suggests that CD27^{low} NK cells are sentinels constantly patrolling the blood circulation and ready to respond to arising infections. Interestingly, compared with other NK-cell subsets, they are uniquely equipped with CX₃CR1,²¹ which could allow them to interact with endothelial cells upon inflammation²⁴ and to rapidly extravasate within tissues upon infection, similar to monocytes.²⁵ A very recent study confirmed our findings by showing that CX₃CR1-positive NK cells are preferentially localized in BM sinusoids.²⁶ Other NK-cell subsets may be recruited from the BM or spleen to inflamed sites at later phases of the response. In particular, previous results showed that CCL3 could overcome CXCL12-induced retention of CD11b^{low} NK cells in the BM and recruit these cells to the blood.¹¹

A previous study showed that SIP5 was required for NK-cell exit from the BM.¹⁰ Our present data confirm these findings and further indicate that mature NK cells are more dependent on SIP5 than immature NK cells for their exit. Indeed, CD27^{low} NK cells are very infrequent in BM sinusoids and are virtually absent from LN sinusoids in SIP5^{-/-} mice. This fits well with our previous data showing that SIP5 expression is up-regulated upon NK-cell maturation.⁵ The lack of NK cells in the BM and LN sinusoids is not because of a defect in their differentiation, but rather results from their abnormal accumulation in BM and LN parenchyma (present results and Walzer et al⁵). The difference between the BM and LNs in terms of SIP5 dependency for exit is unclear at the time, but could be linked to the nature of the exit sinusoids, which are venous for BM and lymphatic for the LNs. Endothelial or other stromal cells in the BM may provide additional exit signals. Moreover, the local SIP concentration could be different in BM and LN sinusoids, as suggested by a previous study showing that separate sources provide SIP to plasma and lymph.²⁷ How does SIP5 function to promote NK-cell exit from lymphoid organs? Several lines of evidence suggest that SIP5 could function similarly to SIP1. In particular, as in the case of SIP1,²² cyclical internalization of SIP5 is likely to occur in vivo during NK-cell trafficking. In agreement with this, we found that NK cells located in blood that contains high SIP concentration are poorly responsive to SIP, unlike BM NK cells, which may favor reentry into lymphoid organs. Like SIP1, SIP5 contains a stretch of serines in the C-terminus region that could be important for receptor internalization.²⁸ However, there are also several important differences between these 2 receptors. For example, SIP1 but not SIP5 contains 2 sites of tyrosine sulfation in its extracellular region that increase affinity for SIP.²⁹ Moreover, SIP1 but not SIP5 is internalized in response to FTY720 treatment,¹⁰ which may explain why FTY720 sequesters T cells in lymphoid organs but has no effect on NK-cell trafficking.⁵

In the BM, a significant number of immature NK cells were capable of reaching sinusoids in an SIP5-independent fashion. These results suggest that receptors other than SIP5 may induce NK-cell exit from the BM. Candidate receptors include SIP1, which has been shown to be expressed at low levels in NK cells and to contribute to NK-cell exit from the BM.¹⁰ NK cells also express many receptors for pro-inflammatory chemokines (eg, CCR5 and CXCR3). Expression of low levels of these chemokines may participate in the recruitment of NK cells at the periphery, similar to what has been described for inflammatory monocytes.³⁰

We found that CXCR4 expression progressively decreased from the CD11b^{low} to the CD27^{low} maturation stage. In particular, CD27^{low} NK cells expressed much lower surface levels of CXCR4 (present study) and lower *CXCR4* mRNA levels compared with the other subsets.³ The different CXCR4 surface levels in NK-cell subsets was well correlated with their responsiveness to CXCL12, which was found to decrease upon maturation. When we treated mice with AMD3100, a selective CXCR4 antagonist, CD11b^{low}, and to a lesser extent DP but not CD27^{low}, NK cells were recruited to BM sinusoids and peripheral blood. This indicates that CXCR4 retains immature NK cells in the BM parenchyma, presumably to ensure full development of these cells in an optimal environment²³ before their release into the periphery. One key question regarding the control of NK-cell exit was the mechanism by which NK cells overcome CXCR4-mediated retention. There were 2 possibilities: either the SIP5 signal was sufficient to induce NK-cell exit or CXCR4 also had to be desensitized. To discriminate between these hypotheses, we used a novel mouse model (*Cxcr4*^{+/-1013} mice), in

Figure 5. NK cells accumulate in the BM and LNs of *Cxcr4*^{+/-1013} mice. Flow cytometric analysis of NK cells in the blood, spleen, LNs, and BM from WT and *Cxcr4*^{+/-1013} mice stained for CD3 and NK1.1 expression. (A) Representative dot plots of CD3/NK1.1 expression. (B-C) Mean frequency (B) and number of gated NK cells (C; NK1.1⁺ CD3⁻) in the different organs. (D) Flow cytometric analysis of NK cells in the BM and LNs from WT and *Cxcr4*^{+/-1013} mice injected with anti-CD45 mAb and then stained in vitro with Abs for CD3 and NK1.1. The percentage of CD45⁺ cells among gated NK cells was measured. Results represent the means ± SD of 7-8 mice in each group (B) with 1 dot-plot representing 1 mouse (A), all analyzed littermates (C, lines indicate the mean and each symbol represents an individual mouse), or are from 4 independent experiments (D).



which one of the 2 *CXCR4* alleles encodes a truncated CXCR4 receptor that cannot be inactivated. The *CXCR4*¹⁰¹³ mutation has been originally described in patients with WS.¹⁵ Its failure to desensitize and internalize is thought to result from the distal truncation of the C-tail that removes serine/threonine residues, thus preventing site-specific phosphorylation by GPCR kinases.³¹ Our results show that CXCR4 desensitization is required for the exit of all NK-cell subsets from the BM. In agreement with experiments using AMD3100, the effect of the *CXCR4*¹⁰¹³ mutation was more pronounced for immature NK cells. Interestingly, the reduction in mature CD27^{low} NK cells was also much more severe in the blood than in the BM sinusoids in these mice. This could be indirectly because of the important reduction in the exit of immature NK cells from the BM. Indeed, NK cells can also mature at the periphery, as shown by adoptive transfer experiments of immature NK cells.^{3,32} Therefore, a reduction in immature NK cells at the periphery is expected to result in a decrease in mature NK cells. Homeostatic effects could also explain the increase in LN NK cells observed in *Cxcr4*^{+/-1013} mice that occurs even though NK-cell exit from the LNs is not decreased in these mice. This increase is mostly because of an increase in DP NK cells, which are known to accumulate in conditions of NK-cell proliferation.^{3,5} Increased CXCR4 signaling could therefore lead to an enhanced NK-cell proliferation in *Cxcr4*^{+/-1013} LNs. In agreement with this, a recent study showed that CXCL12 increased the number of NK cells obtained in cultures of BM progenitors with IL-15.²³

How is CXCR4 desensitized in BM NK cells? Our in vitro and ex vivo results indicate that S1P5 engagement is not the cause of CXCR4 desensitization, but rather is a concomitant and independent event. Therefore, CXCR4 is likely to be desensitized by CXCL12, which is produced at high concentrations in the BM microenvironment next to clusters of developing NK cells.²³ A recent study modeling the behavior of cells exposed to competing chemokine gradients concluded that receptor desensitization is in fact crucial for cells to integrate signals from different chemoattractants.³³ Therefore, transient CXCR4 desensitization within the BM may facilitate NK-cell exit induced by S1P via S1P5. Reciprocally, S1P5 level could be cyclically modulated during NK-cell trafficking, depending on the local concentration of S1P, as suggested by

our findings that responsiveness to S1P is higher for BM NK cells than for blood ones. Therefore, modulation of responsiveness to CXCL12 and S1P may favor recirculation of NK cells across the BM and blood. CXCR4 and S1P5 responsiveness are also regulated

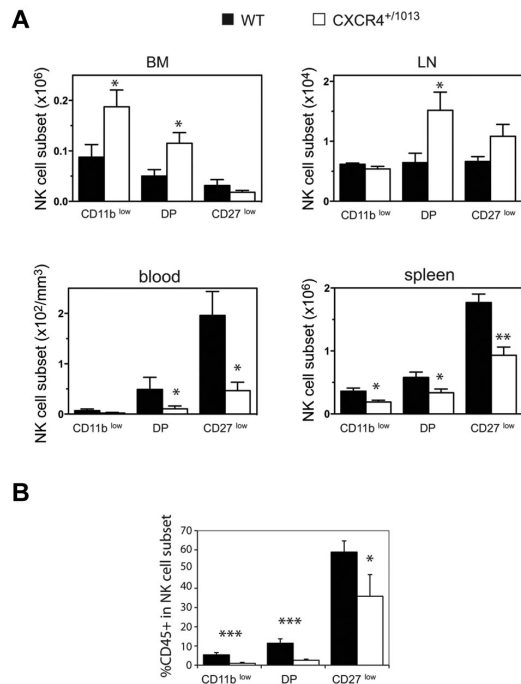


Figure 6. NK-cell subsets accumulate in the BM parenchyma area of *Cxcr4*^{+/-1013} mice. (A-B) Flow cytometric analysis of NK-cell subsets in the blood, spleen, LNs, and BM from WT and *Cxcr4*^{+/-1013} mice stained for CD3, NK1.1, CD11b, and CD27. (A) Number of gated NK cells of each subset in the different organs. (B) WT and *Cxcr4*^{+/-1013} mice were injected with anti-CD45 and then stained in vitro for CD3, NK1.1, CD11b, and CD27. The percentage of CD45⁺ cells among gated NK cells of each subset was assessed in the BM from WT (black bars) and *Cxcr4*^{+/-1013} mice (white bars). Results represent the means ± SD of 4-5 mice in each group.

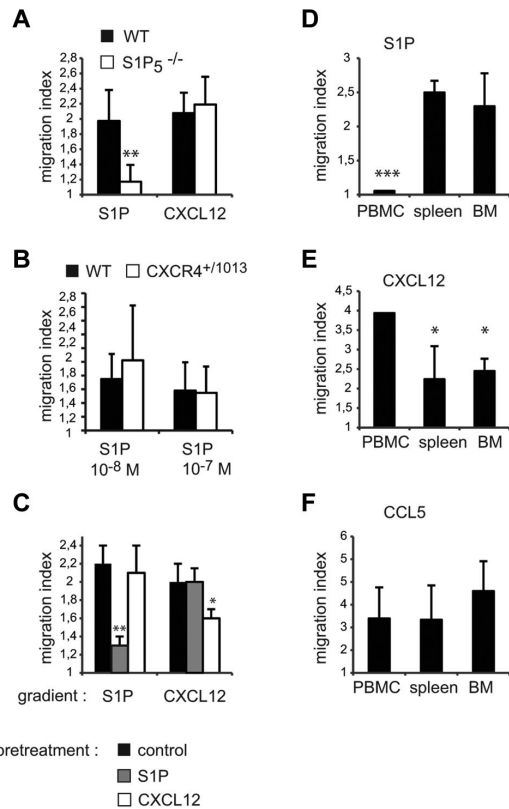


Figure 7. CXCR4 and S1P5 responsiveness are modulated on mature NK cells. (A-B) BM cells were isolated from WT and S1P5^{-/-} (A) or *Cxcr4*^{+/-1013} (B) mice and migration of CD27^{low} NK cells toward S1P or CXCL12 gradients was measured. (C) Spleen cells from WT mice were incubated for 2 hours in serum-free medium supplemented or not with S1P (10⁻⁸ M) or CXCL12 (50 ng/mL). Migration of CD27^{low} NK cells toward S1P or CXCL12 gradients was then assessed. (D-F) Lymphocytes were isolated from blood, spleen, and BM. Migration of mature NK cells toward S1P (D), CXCL12 (E), and CCL5 (F) gradients was assayed. The migration index is calculated as the ratio between the number of cells migrating in the chemokine and in the control (without chemokine) condition. Data are the mean ± SD of 4-5 independent experiments with duplicates.

at the gene-expression level, because we observed a coordinated switch between CXCR4 and S1P5 expression during NK-cell maturation. Such a change in responsiveness to chemoattracting factors during differentiation has already been described for B cells.¹² This switch between CXCR4 and S1P5 is likely to maintain the differential distribution of immature and mature NK cells.

The number of peripheral NK cells is also decreased in some patients with WS.^{34,35} Moreover, CXCR4 has been shown to retain human NK cells to the BM and spleen in NOD/SCID mice reconstituted with human immune system.³⁶ We reported previ-

ously that S1P5 was up-regulated during human NK-cell differentiation.⁵ Therefore, the mechanism controlling NK-cell exit from the human BM is likely to be similar to the one we describe here in the mouse counterpart. The paucity of peripheral NK cells in WS patients could render them more susceptible to viral infections and, indeed, WS patients suffer from severe HPV-induced diseases.³⁷ Although the role of NK cells in HPV infections is still poorly documented, recent evidence suggests their involvement. In particular, an association between the lack of KIR3DS1 and KIR2DS1 activating NK-cell receptors and the susceptibility to recurrent respiratory papillomatosis has been reported.³⁸ Moreover, cases of disseminated *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection have been reported in patients with a new immunodeficiency syndrome related to CXCR4 dysfunction.³⁹ Because these patients display a severe defect in circulating NK cells, and because MAC infections have been associated with reduced NK cell activity,⁴⁰ one can speculate that a reduction in peripheral NK-cell numbers contributes to the susceptibility to HPV and MAC infections in such leukopenic patients.

Acknowledgments

The authors thank the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris; the flow cytometry facility of IFR128; A. Calver (GlaxoSmithKline) for providing S1P5 knockout mice; L. Bouchet-Delbos and A. Bignon (Université Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chemokines and Immunopathology," Inserm UMR_S996, Clamart, France) for their technical help; Dr F. Baleux (Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris) for providing us with CXCL12 proteins; and Drs F. Bachelierie (Université Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chemokines and Immunopathology," Inserm UMR_S996, Clamart), T. Henry, M. C. Michallet, and Y. Leverrier for critical reading of the manuscript.

The Walzer laboratory is supported by the FINOVI foundation, Agence Nationale de la Recherche (ANR), Inserm, Ligue contre le Cancer (Comité du Rhône), and Université de Lyon. The Balabanian laboratory is supported by the ANR (grant number 2010 JCJC 1104 01), the Université Paris-Sud, Inserm, and the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Val d'Oise), and is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

Authorship

Contribution: T.W., K.B., and J.M. designed the experiments and wrote the manuscript and T.W., V.B., and K.M. performed all of the experiments.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Thierry Walzer, Inserm U851, 21 avenue Tony Gamier, 69007 Lyon, France; e-mail: thierry.walzer@inserm.fr; or Karl Balabanian, Inserm UMR_S 996, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart, France; e-mail: karl.balabanian@u-psud.fr.

References

- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-510.
- Diefenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*. 2001;181:170-184.
- Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*. 2009;113(22):5488-5496.
- Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol*. 2006;176(3):1517-1524.
- Walzer T, Chiossone L, Chaix J, et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1337-1344.
- Rosen H, Sanna G, Alfonso C. Egress: a receptor-regulated step in lymphocyte trafficking. *Immunol Rev*. 2003;195:160-177.
- Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

BLOOD, 3 NOVEMBER 2011 • VOLUME 118, NUMBER 18

ROLE OF CXCR4 AND S1P5 IN NK-CELL TRAFFICKING 4871

- cell recruitment. *J Exp Med.* 2005;202(12):1679-1689.
- Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):753-763.
 - Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1295-1301.
 - Jenne CN, Enders A, Rivera R, et al. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J Exp Med.* 2009;206(11):2469-2481.
 - Bernardini G, Sciumè G, Bosisio D, Morrone S, Sozzani S, Santoni A. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood.* 2008;111(7):3626-3634.
 - Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med.* 2001;194(1):45-56.
 - Zhang N, Oppenheim JJ. Crosstalk between chemokines and neuronal receptors bridges immune and nervous systems. *J Leukoc Biol.* 2005;78(6):1210-1214.
 - Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, et al. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 2005;25(6):1459-1469.
 - Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood.* 2005;105(6):2449-2457.
 - Pereira JP, An J, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat Immunol.* 2009;10(4):403-411.
 - Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science.* 2010;328(5982):1129-1135.
 - Grigorova IL, Schwab SR, Phan TG, Pham THM, Okada T, Cyster JG. Cortical sinus probing, S1P1-dependent entry and flow-based capture of egressing T cells. *Nat Immunol.* 2009;10(1):58-65.
 - Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(4):319-326.
 - Kawai T, Malech HL. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(1):20-26.
 - Grégoire C, Chasson L, Luci C, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007;220:169-182.
 - Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med.* 2005;201(2):291-301.
 - Noda M, Omatsu Y, Sugiyama T, Oishi S, Fujii N, Nagasawa T. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood.* 2011;117(2):451-458.
 - Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):694-703.
 - Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-670.
 - Sciumè G, De Angelis G, Benigni G, et al. CX3CR1 expression defines 2 KLRG1+ mouse NK-cell subsets with distinct functional properties and positioning in the bone marrow. *Blood.* 2011;117(17):4467-4475.
 - Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science.* 2007;316(5822):295-298.
 - Thangada S, Khanna KM, Blaho VA, et al. Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. *J Exp Med.* 2010;207(7):1475-1483.
 - Fieger CB, Huang M-C, Van Brocklyn JR, Goetzl EJ. Type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor signaling of lymphocyte functions requires sulfation of its extracellular amino-terminal tyrosines. *FASEB J.* 2005;19(13):1926-1928.
 - Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7(3):311-317.
 - Balabanian K, Levoye A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1074-1084.
 - Kim S, Iizuka K, Kang H-S, P, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol.* 2002;3(6):523-528.
 - Lin F, Butcher EC. Modeling the role of homologous receptor desensitization in cell gradient sensing. *J Immunol.* 2008;181(12):8335-8343.
 - Mc Guire PJ, Cunningham-Rundles C, Ochs H, Diaz GA. Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol.* 2010;135(3):412-421.
 - Siedlar M, Rudzki Z, Strach M, et al. Familial occurrence of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis (WHIM) syndrome. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008;56(6):419-425.
 - Beider K, Nagler A, Wald O, et al. Involvement of CXCR4 and IL-2 in the homing and retention of human NK and NK T cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID mice. *Blood.* 2003;102(6):1951-1958.
 - Chow KYC, Brotin É, Ben Khalifa Y, et al. A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell Host Microbe.* 2010;8(6):523-533.
 - Bonagura VR, Du Z, Ashouri E, et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol.* 2010;71(2):212-219.
 - Doncker A-V, Balabanian K, Bellanné-Chantelot C, et al. Two cases of disseminated Mycobacterium avium infection associated with a new immunodeficiency syndrome related to CXCR4 dysfunction. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):135-139.
 - Wendland T, Herren S, Yawalkar N, Cerny A, Pichler WJ. Strong alpha beta and gamma delta TCR response in a patient with disseminated Mycobacterium avium infection and lack of NK cells and monocytopenia. *Immunol Lett.* 2000;72(2):75-82.

Figure S1. Identification of the LN compartment by *in vivo*-injected anti-CD45 Mab

WT mice were injected with anti-CD45-PE Mab (in red in the figure) as indicated in the methods. Sections of inguinal LN from these mice were stained with antibodies against LYVE-1 (blue) and NKp46 (green). (B) and (C) show magnifications corresponding to the white square areas in (A). White arrows show vessel-like structures lined by LYVE-1 staining and containing clusters of CD45 positive cells.

Figure S2. Expression of CXCR4 by NK cell subsets in the spleen and blood

Spleen cells or PBMC were stained for NK1.1, CD3, CD27, CD11b and CXCR4 or isotype control (grey line). Expression of CXCR4 (black line) or isotype (grey histogram) by gated NK cell subsets, as indicated. Data show representative results of three independent mice.

Figure S3. Enhanced CXCL12-promoted chemotaxis of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ NK cells

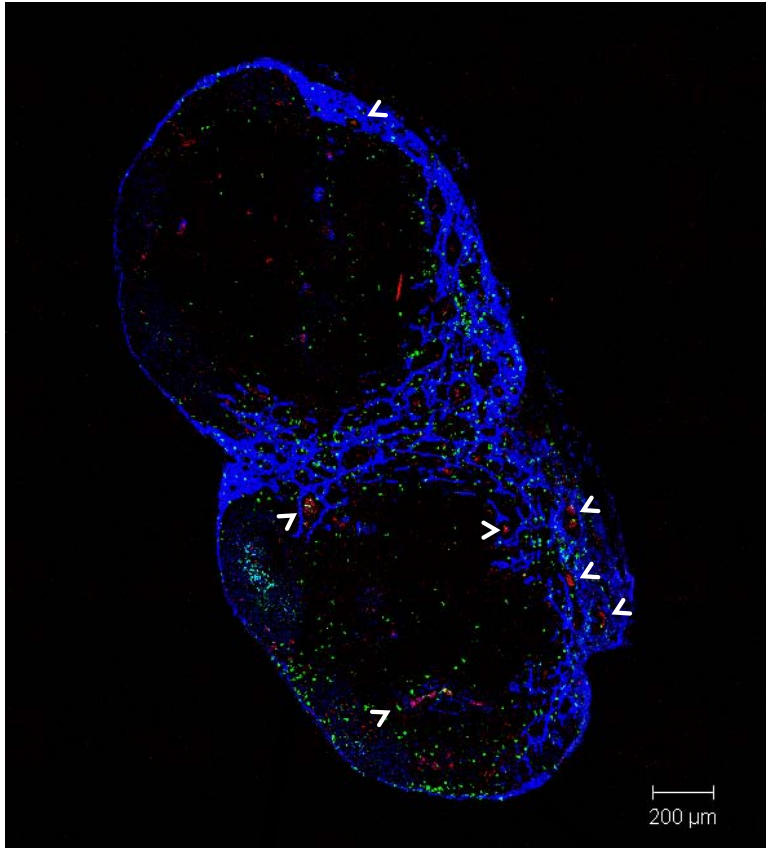
(A) Flow-cytometric analyses of endogenous CXCR4 expression on BM NK cells (gated CD3⁻NK1.1⁺) of WT (dashed histograms) and *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ (+/1013, black histograms) mice. Background fluorescence (gray histograms) was evaluated using the corresponding PE-conjugated, immunoglobulin-isotype control Ab. (B and C) Migration of BM NK cells (B) or NK cell subsets (C) from WT (white bars) and +/1013 mice (black bars) in response to 10 nM CXCL12 unless specified. Results are expressed as a migration index. (D and E) Cell surface expression of CXCR4 on BM NK cells (D) or NK cell subsets (E) from WT (white bars) and +/1013 (black bars) mice treated with 250 nM CXCL12 unless specified for 45 min at 37°C. Results indicate the amount of receptors that remains at the cell surface after incubation with agonist. CXCR4 expression at the surface of NK cells incubated in medium alone was arbitrarily set as 100%. Results represent the means ± SD of 3 independent experiments (B–E) or are representative of 3 independent determinations (A).

Figure S4. No effect of AMD3100 on *ex vivo* responsiveness of NK cells to S1P

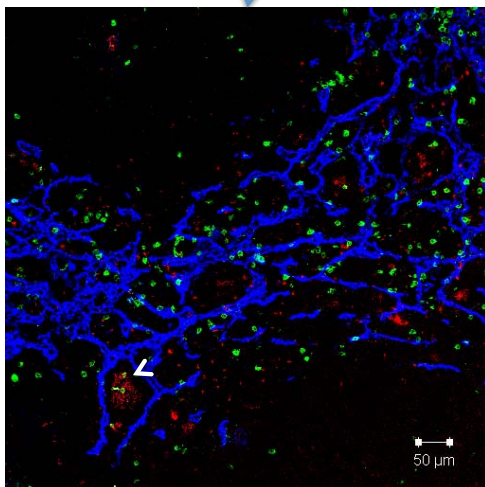
WT mice were treated or not with AMD3100. 1 h later, spleen cells were isolated and migration of CD27^{low} NK cells towards S1P gradients was measured. The migration index is calculated as the ratio between the number of cells migrating in the chemokine and in the control (without chemokine) condition. Data are the mean ± SD of 3 independent experiments with duplicates.

A

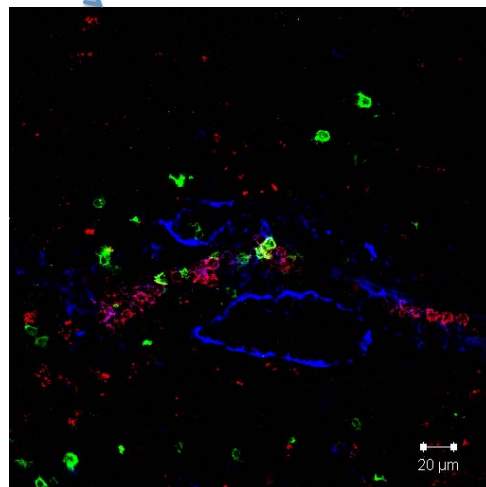
Figure S1



B



C



*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

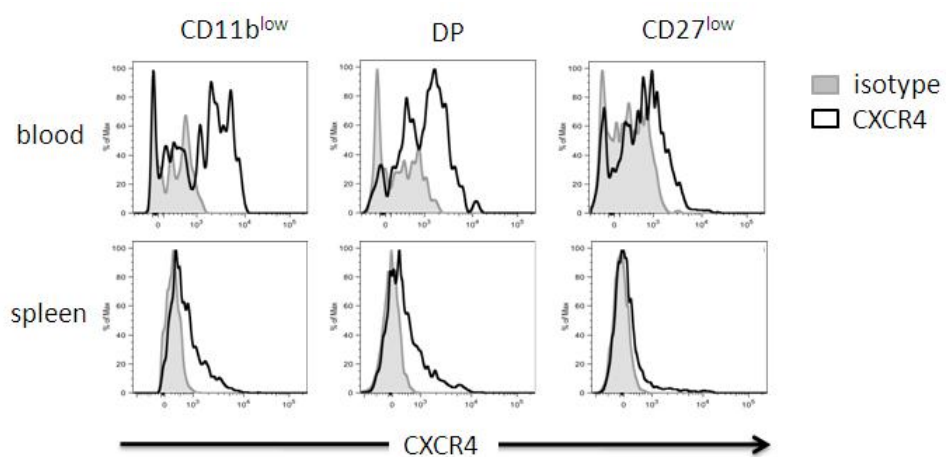


Figure S2

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

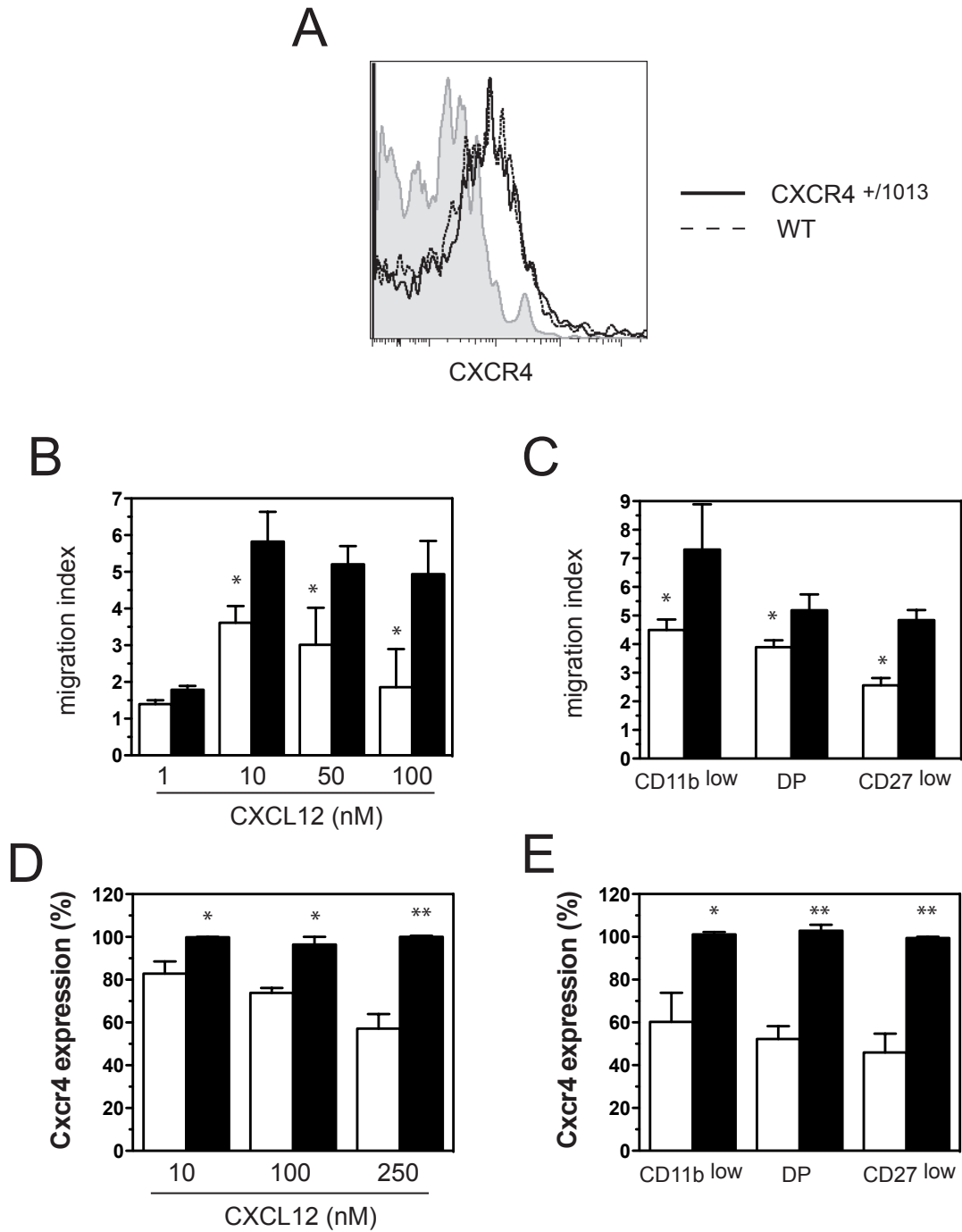


Figure S3

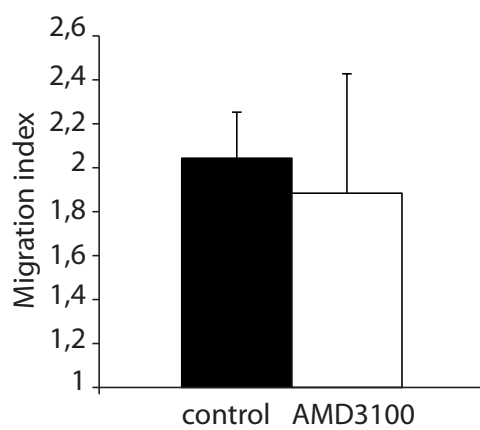


Figure S4

3- Conclusion et perspectives

Dans cette étude, que je signe en seconde position, nous mettons en évidence que la sortie des NK depuis la MO vers le sang nécessite deux signaux : la désensibilisation de Cxcr4 et l'engagement de S1P5. Nous avons démontré que la désensibilisation de Cxcr4 n'est pas induite par S1P5 de même que Cxcr4 ne génère pas de désensibilisation hétérologue de S1P5. De fait, il semblerait que les processus de désensibilisation séquentiels de Cxcr4 et S1P5 soient dus à leurs ligands pour favoriser la sortie des NKs. Les changements de sensibilité de Cxcr4 et S1P5 sont donc des processus coordonnés mais indépendants. Enfin, la sortie des NK des GLs est entièrement dépendante de S1P5 et non de Cxcr4.

Nous avons aussi confirmé que les stades matures sont les plus affectés par la perte du récepteur S1P5, mais nous avons observé par ailleurs que les stades précoces et immatures sont plus efficacement retenus dans le parenchyme médullaire *via* Cxcl12. A l'aide de techniques de marquage par injection d'Ac anti-CD45 fluoromarkés, nous avons pu également observer que la compartimentalisation des lymphocytes NK matures est sinusoïdale tandis que celle des stades antérieurs est préférentiellement parenchymateuse. De façon intéressante, la MO des souris $Cxcr4^{+/1013}$ présente une accumulation des NK précoces et immatures, ce qui indique que contrairement aux LB, la différenciation de ces cellules n'est pas affectée et la lymphopénie NK des souris $Cxcr4^{+/1013}$ n'est pas due à un problème hématopoïétique.

Nous avons en outre remarqué que l'utilisation de cette technique est applicable à l'étude des processus de sortie des GL, et mis en évidence que S1P5 est beaucoup plus important pour la sortie ganglionnaire que médullaire. A l'instar des populations LT et LB, la population NK contribue aussi à l'hypercellularité ganglionnaire des souris $Cxcr4^{+/1013}$. Il est intéressant de voir que le stade immature est responsable de cette surreprésentation, et que la population NK est sous-représentée dans la rate de ces souris. Le stade immature des NK se retrouve physiologiquement dans les GLs. En revanche, cette surreprésentation spécifique dans les souris $Cxcr4^{+/1013}$ pourrait être due à une prolifération ou à une survie exacerbée. En revanche, les NK porteurs de la mutation $Cxcr4^{1013}$ ne semblent pas présenter de défaut de sortie des GL, ce qui suggère que le gain de fonction de Cxcr4

n'altère pas la sortie des NK et laisse supposer une fonctionnalité normale des vaisseaux lymphatiques efférents malgré leur distribution anormale.

Concernant le SW, une question réside quant à la possibilité de favoriser la sortie des lymphocytes depuis la MO afin de corriger la lymphopénie. Ces résultats indiquent que l'utilisation d'agonistes de S1P5 pourrait favoriser la sortie des NK médullaires et ganglionnaires et être potentialisée par l'AMD3100.

De façon analogue, il n'est pas à exclure que l'utilisation d'agonistes de S1P1, récepteur impliqué dans la sortie des LB immatures depuis la MO (Allende *et al.*, 2010) et des LT CD4⁺ et CD8⁺ du thymus (Allende *et al.*, 2004), pourrait être une solution pour favoriser la sortie des lymphocytes nouvellement produits et pour restaurer le trafic périphérique. Un effet secondaire prédictible pourrait être en revanche une libération des CSH (Bendall & Basnett, 2013).

A la lumière de ce projet, nous avons observé que les NK ganglionnaires porteurs du gain de fonction ne présentaient pas de défaut de sortie, malgré l'architecture altérée des GLs. Nous avons alors écarté, pour cette population et cet organe, l'hypothèse d'un défaut dû à l'environnement. En revanche, la lymphopénie NK n'est pas due à un problème de différenciation médullaire. Nous avons poursuivi nos études sur les LB et LT, qui présentent un défaut de développement au sein de leurs OLP, pour déterminer s'il existe un défaut de sortie analogue aux NK, et quel rôle joue l'environnement sur la domiciliation périphérique.

III- La désensibilisation de Cxcr4 régule de façon intrinsèque aux cellules l'homéostasie lymphocytaire et l'immunité humorale

1- Rationnel

L'hyperactivité de Cxcr4 altère la biologie lymphocytaire à la fois dans les OLP et les OLS (Balabanian *et al.*, 2012), cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires ne sont pas connus. Nous avons précédemment observé dans un modèle murin que l'introduction d'une mutation de gain de fonction de *Cxcr4*¹⁰¹³ à l'état hétérozygote

génère des altérations de la lymphopoïèse et de la distribution périphérique des lymphocytes. Dans cette étude, nous avons produit et caractérisé dans le modèle murin homozygote pour la mutation gain de fonction les altérations de la lymphopoïèse et de la compartimentalisation périphérique. Les cellules de ce modèle n'expriment que des récepteurs Cxcr4¹⁰¹³ dont l'extrémité C-terminale est tronquée. Celles-ci sont théoriquement incapables de recruter les GRK *via* ce domaine de Cxcr4¹⁰¹³. *In extenso*, le processus de désensibilisation ne peut être mis en place. Le modèle murin homozygote permet donc de caractériser finement la contribution du domaine C-terminal dans la mise en place de la signalisation cellulaire et ses effets sur le développement et la compartimentalisation lymphocytaire, en excluant une potentielle compensation de l'allèle codant pour un récepteur sauvage.

Ce but de cette étude a été d'approfondir, à l'aide des modèles hétérozygote et homozygote d'hyperactivation de Cxcr4, les mécanismes cellulaires menant à la lymphopénie. Pour cela, il s'agit de déterminer les parts contributives des altérations de l'hématopoïèse et de la domiciliation périphérique dans ce processus. Plus spécifiquement, il s'agit en premier lieu de déterminer par cytométrie en flux le stade défectueux du développement des LB, qui présentent une réduction de la fraction ProB/PreB, et des LT, dont la fraction DN est diminuée. Ensuite, il convient de déterminer à l'aide d'expériences de reconstitution d'hématopoïèse par compétition si ces altérations sont dues à un processus intrinsèque aux lymphocytes porteurs de la mutation ou à une altération du microenvironnement. L'étude de la compartimentalisation périphérique s'est poursuivie à l'aide de co-transferts adoptifs afin d'évaluer les profils migratoires des lymphocytes porteurs de la mutation et les processus de sortie ont été évalués avec l'utilisation de la méthode d'injection *in vivo* d'Ac Anti-CD45 décrit pour l'étude sur les NK (Mayol *et al.*, 2011). Enfin, l'utilisation d'un système artificiel d'immunisation basé sur l'injection d'ovalbumine adjuvantée nous a donné la possibilité de caractériser la réponse humorale chez les souris hétérozygotes, et notamment l'effet d'un stress sur la structuration des GL.

2- Exposé des travaux

*Article n°3 : « Fine-tuning CXCR4 desensitization in lymphopoiesis
intrinsically regulates lymphocyte homeostasis and humoral immunity »
(Soumis à J Exp Med)*

**Fine-tuning Cxcr4 desensitization in mouse lymphopoiesis intrinsically
regulates lymphocyte homeostasis and humoral immunity**

Vincent Biajoux^{1,2}, Christelle Freitas^{1,2,\$}, Antoine Sacquin^{3,4,5,\$}, Patrice Hemon⁶,
Françoise Gaudin^{1,2}, Nicolas Fazilleau^{3,4,5} and Karl Balabanian^{1,2*}

¹Univ. Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chemokines and Immunopathology", UMR_S996, Clamart F-92140, France; ²INSERM, Univ. Paris-Sud, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart F-92140, France; ³INSERM, U1043, Toulouse F-31300, France; ⁴CNRS, U5282, Toulouse F-31300, France; ⁵Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, F-31300, France; and ⁶Plateforme d'Histologie (PHIC), Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), Clamart F-92140, France.

^{\$}CF and AS contributed equally to this work.

***Correspondence:** Karl Balabanian, PhD; INSERM UMR_S996, Univ. Paris-Sud, LabEx LERMIT, 32 rue des Carnets, Clamart F-92140, France; Phone: 33.(0)1.41.28.80.03; Fax: 33.(0)1.46.32.79.93; E-mail: karl.balabanian@u-psud.fr.

Abbreviations: ASC: Ab-secreting cell; C-tail: Carboxyl-terminal tail; GC: Germinal center; HEL: Hen egg lysozyme; LO: Lymphoid organ; PC: Plasma cell; PNA: Peanut agglutinin; S1P1: Sphingosine 1-phosphate receptor type 1; SDF-1: Stromal cell-Derived Factor 1; TD: Thymus-dependent; Tfh: Follicular helper T cell; WS: Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis Syndrome.

Total character count: 43,884

ABSTRACT

CXCR4 desensitization is required for efficient lymphopoiesis and peripheral compartmentalization of lymphocytes, but the underlying molecular and cellular mechanisms are still unclear. Here we show that fine-tuning Cxcr4 desensitization intrinsically regulates murine B- and T-cell development, peripheral trafficking and function. Mice carrying a Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis Syndrome-linked heterozygous *Cxcr4* mutation, which encodes for a desensitization-resistant truncated carboxyl-terminal tail (C-tail) receptor, had incomplete double-negative (DN) 2-to-DN3 and pro-B-to-pre-B stages progression in the thymus and bone marrow (BM), respectively. The resulting lymphopenia was cell-autonomous and followed a mutated allele dose-dependent pattern. Impaired Cxcr4 desensitization altered egress of newly generated immature B cells from the BM to the blood and conversely forced homing and retention of mature recirculating B and T cells in the BM parenchyma. While spleen follicular hypoplasia reflected the circulating lymphopenia in mutant mice, impaired egress of lymphocytes was responsible for their accumulation in lymph nodes (LNs). Despite these immune alterations, increased antigen-specific germinal center B cells and switched plasma cells were observed in LNs after immunization. Our results establish the C-tail domain in Cxcr4-mediated signaling as a pivotal regulator of lymphocyte homeostasis and fitness.

INTRODUCTION

The Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis Syndrome (WS) is a rare combined immuno-hematological disorder characterized in patients by chronic pan-leukopenia that affects notably circulating B and T lymphocytes (Dotta et al., 2011; Kawai and Malech, 2009). Despite such severe immune dysfunctions, WS patients show a limited susceptibility to pathogens with the notable exception of human papillomavirus and respiratory encapsulated bacteria (Kawai and Malech, 2009). Following immunization, patients are able to mount cellular and humoral immune responses, indicating that adaptative immunity is not completely defective (Handisurya et al., 2010; Mc Guire et al., 2010). However, vaccination failures have been reported, which suggest a defective maintenance of protective memory responses (Gulino et al., 2004). The discovery that most WS cases were associated with dysfunctions of the axis formed by the CXC α -chemokine Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) and its receptor CXCR4, which result from a heterozygous gain-of-function mutation in the *CXCR4* gene, opened leads for understanding disease pathogenesis (Dotta et al., 2011; Kawai and Malech, 2009). Because CXCR4 is widely expressed on non-hematopoietic cells and all leukocytes (Zlotnik et al., 2011), we hypothesized that circulating pan-leukopenia could arise from altered CXCR4-mediated signaling that would skew tissue distribution and differentiation of leukocytes.

Recently, we produced major breakthroughs in the pathophysiology of the WS by generating a knock-in mouse strain (*Cxcr4*^{+/*1013*}) that harbors a WS-linked heterozygous mutation of the *Cxcr4* gene, which causes a distal truncation of the last 15 residues in the carboxyl-terminal tail (C-tail) and engenders a desensitization-resistant receptor

(Balabanian et al., 2012). Mutant mice displayed leukocytes with enhanced migration to Cxcl12 and phenocopied severe pan-leukopenia. In-depth analysis of immune organs unveiled differential requirements for leukocyte lineages on Cxcr4-mediated signaling. Although myelopoiesis was preserved, impaired Cxcr4 desensitization impacted on B- and T-cell development, likely accounting for chronic lymphopenia. However, whether defective lymphocyte development and lymphopenia result from a hematopoietic cell-intrinsic defect or an alteration of the lymphoid organ (LO) microenvironment remains to be established. Proper desensitization of Cxcr4 is further required for the trafficking of lymphocytes between LOs and the bloodstream. Recirculating mature B cells were surprisingly preserved in the BM of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ mice, suggesting an exacerbated tropism for these cells towards BM. Analyses of secondary LOs revealed a follicular hypoplasia in the spleen and the absence of primary follicles in LNs mirrored by an expansion of the T-cell zone. One question pertains to the mechanisms accounting for such altered lymphocyte compartmentalization, which could result from impaired entry, egress, proliferation and/or apoptosis. Unexpectedly, serum IgM and IgG levels were found to be high in non-manipulated mutant mice, raising questions about where and how B- and T-cell interactions occur and lead to the production of antibody (Ab)-secreting cells (ASCs) at the basal level and hence, upon experimental immunization. Finally, such original knock-in model provides a unique opportunity to assess the biochemical and phenotypic effects of the homozygous *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation.}

In this paper, we show that fine-tuning Cxcr4 desensitization intrinsically controls lymphocyte development, peripheral trafficking and function. The C-tail truncating *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation, that causes differential signaling capacities depending on its

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

heterozygous *versus* homozygous status, negatively impacted on early stages of B and T lymphopoiesis following an allele dose-dependent manner. The resulting circulating lymphopenia was due to hematopoietic cell-intrinsic defects. The gain-of-Cxcr4-function impaired the release of immature B cells from the BM into the blood and forced homing of mature peripheral B and CD4⁺ T cells to the BM. Concomitantly, impaired egress constituted the major mechanism responsible for B- and T-cell accumulation in peripheral LNs of mutant mice, while lymphocyte reduction in the spleen reflected the circulating lymphopenia. When challenged with thymus-dependent (TD) antigen (Ag), *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice mounted systemic primary and secondary humoral responses with a similar magnitude compared with wild-type (WT) mice. This was associated with a local increase in Ag-specific B cells acquiring germinal center (GC) features and plasma cells (PC) in draining LNs (dLNs). This seemed to occur independently of Ag-specific CD4⁺ follicular helper T (Tfh) cells. These results provide new details about B- and T-cell development, compartmentalization and function by establishing the C-tail in Cxcr4-mediated signaling as a pivotal regulator of these processes.

RESULTS

Homozygous *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation leads to membrane expression of desensitization-resistant Cxcr4 receptors

In lymphocytes from *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ mice, we recently found that Cxcr4 is refractory to Cxcl12-promoted internalization while its steady-state level is preserved at the cell surface (Balabanian et al., 2012). Although this finding was reminiscent to what reported in patient-derived cells and cellular models expressing WS-associated mutant CXCR4 (Balabanian et al., 2005; Gulino et al., 2004), the situation is somewhat puzzling if one considers that both WT and mutant *Cxcr4* alleles are expressed at equal levels. Another question pertains to the membrane availability of the mutant Cxcr4¹⁰¹³ and its ability to interact biochemically and/or physically with its WT counterpart. To exclude any potential interference of the *Cxcr4*⁺ allele, we produced *Cxcr4*^{1013/1013} mice. Membrane expression levels of Cxcr4 were in the same range between spleen WT, *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ and *Cxcr4*^{1013/1013} lymphocytes (Fig. 1A). Spleen lymphocytes from *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ and *Cxcr4*^{1013/1013} mice similarly displayed impaired Cxcr4 internalization following Cxcl12 stimulation (Fig. 1B) and increased responsiveness to Cxcl12-promoted chemotaxis, which was abolished by the specific Cxcr4 antagonist AMD3100 and did not extend to other lymphoid chemokines (Fig. 1C). Cxcl12 addition resulted in bell-shaped dose-response patterns for lymphocytes from both types of mice but with different sensitivities when compared to WT cells. The half-maximal effective concentration of Cxcl12 decreased in *Cxcr4*^{1013/1013} cells while the maximal chemotactic effect increased in *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ cells, indicating higher potency and efficiency of Cxcl12 toward mutant cells. This could rely on the differential signaling capacities of the truncated Cxcr4¹⁰¹³ receptor}}}}

depending on its heterozygous *versus* homozygous status, as revealed by Erk1/2 phosphorylation kinetics (Fig. 1D). In spleen WT B cells, Cxcl12-promoted Erk1/2 phosphorylation was rapid and transient, reaching a maximum at 5 minutes and then declining over time. In $Cxcr4^{+/1013}$ B cells, Erk1/2 activation was increased at 1 minute and persisted at longer time points, thus extending observations made in patient-derived cells (Lagane et al., 2008). In B cells carrying the homozygous $Cxcr4^{1013}$ mutation, Cxcl12 also triggered an early peak of Erk1/2 activation, which was strongly enhanced, but the amount of activated Erk1/2 decreased over time.

Taken together, these data indicate that the C-tail-truncated $Cxcr4^{1013}$ receptor is functionally expressed on lymphocytes and endows with different signaling properties likely through the formation of oligomers.

$Cxcr4^{1013}$ mutation impairs early stages of lymphopoiesis in an allele dose-dependent manner

We investigated how these differences in cellular behavior could impact on B and T lymphopoiesis and assessed effects of the only presence of $Cxcr4^{1013}$ in these processes. In the BM, $Cxcr4^{1013/1013}$ mice exhibited earlier and more severe defects in B-cell ontogeny than $Cxcr4^{+/1013}$ mice, as illustrated by the significant reduction in both pro-B and pre-B cells (Fig. 2A). Interestingly, despite reduced precursors, mature recirculating B-cell numbers were normal in the BM of $Cxcr4^{+/1013}$ and $Cxcr4^{1013/1013}$ mice. The alteration of early B-cell development in $Cxcr4^{1013/1013}$ mice was associated with enhanced cell death (Fig. 2C, left panels). Of note, $Cxcr4^{+/1013}$ and $Cxcr4^{1013/1013}$ pre-B cells selectively incorporated less BrdU after 4 d of treatment in comparison to WT cells.

In the thymus, DN thymocytes were barely detectable in mutant mice and the representation of the DN1-DN4 subsets was strongly altered in *Cxcr4*^{1013/1013} mice, and to a lesser extent in heterozygous mice (Fig. 2B). As Cxcl12-triggered Cxcr4 signaling has been linked to T-cell viability (Tramont et al., 2010), we determined whether impaired proliferation or survival could contribute to lower DN thymocyte numbers. While mutant DN1 and DN2 thymocytes proliferated robustly as did WT ones, DN3 cells from *Cxcr4*^{1013/1013} mice, and to a lesser extent from *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, showed increased proliferation (Fig. 2C, right panels). This was mirrored by a decreased incorporation of BrdU at the DN4 stage. A greater cell death was observed in DN2 and DN3 thymocytes from *Cxcr4*^{1013/1013} mice, suggesting an important function for the Cxcr4 C-tail in regulating their maintenance.

Altogether, these findings indicate that proper Cxcr4 signaling is required for optimal proliferation and survival of pro-B cells and DN thymocytes as they undergo selection and further develop in primary LOs.

Lymphopenia is a hematopoietic cell-intrinsic defect in mice carrying the *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation

Defective B and T lymphopoiesis, and the resulting circulating lymphopenia (Balabanian et al., 2012), could result from a lymphocyte-intrinsic defect and/or an alteration of the primary LO microenvironment. To distinguish among those possibilities, we performed competitive BM-reconstitution experiments. For this, BM cells from WT CD45.1⁺ mice were mixed at a ratio of 1:1 with either *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ or *Cxcr4*^{1013/1013} (CD45.2⁺) BM cells and transplanted into lethally irradiated WT CD45.1⁺ or mutant CD45.2⁺ recipients (Fig.

3A). After 11 wk, which allowed long-term reconstitution, we analyzed the contribution of each donor-cell populations in BM-chimeric mice (Fig. 3B). In primary LOs, B- and T-cell lineages were dominantly derived from $Cxcr4^{+/1013}$ donor BM cells in mixed chimeras (Fig. 3C and D). Enhanced lymphocyte reconstitution by $Cxcr4^{+/1013}$ BM was highlighted in WT as well as $Cxcr4^{+/1013}$ hosts, indicating a cell-autonomous defect of $Cxcr4^{+/1013}$ lymphocytes. $Cxcr4^{1013/1013}$ BM reconstituted the B-cell lineage in the BM more efficiently than WT BM did in the competitive environment, although the contribution of $Cxcr4^{1013/1013}$ cells tended to decrease as B cells develop (Fig. 3D). In the thymus, the T-cell lineage was equally reconstituted by WT and $Cxcr4^{1013/1013}$ donor cells except for the SP CD8⁺ thymocytes that mostly derived from $Cxcr4^{1013/1013}$ cells. The well-described role of Cxcr4 as a pivotal mediator for hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) homing and retention in the BM niches could account for the competitive advantage conferred by the $Cxcr4^{1013}$ mutation to BM cells for BM engraftment and long-term reconstitution (Kawai et al., 2007; Nie et al., 2008). Consistently, we found significantly fewer $Cxcr4^{+/1013}$ or $Cxcr4^{1013/1013}$ T and B cells in the bloodstream of mixed chimeras (Fig. 3D), indicating that the $Cxcr4^{1013}$ mutation is sufficient to promote circulating lymphopenia, even if naive/immature $Cxcr4^{1013}$ -expressing lymphocytes are not under-represented in primary LOs.

Collectively, these findings suggest that Cxcr4 desensitization is intrinsically required for homing and retention of BM cells in the BM niches, but also for the release of newly generated lymphocytes from primary LOs to the blood.

Cxcr4¹⁰¹³-mediated enhanced trafficking of mature T and B cells to the bone marrow

In-depth analyses of the blood compartment in non-manipulated mutant mice revealed a strong leukopenia that affects both circulating B and T lymphocytes following an allele dose-dependent pattern (Fig. 4A). While naive T cells and mature recirculating B cells were predominantly represented in the peripheral blood of WT mice (Fig. 4A), both subpopulations were significantly deficient in mutant mice, whereas numbers of immature B cells and effector/memory (Eff/Mem) T cells were less affected. This finding was reminiscent to immunophenotypic data obtained from blood samples of WS patients (Gulino et al., 2004). In addition to defective lymphopoiesis, the pathogenesis of lymphopenia in mutant mice might involve a reduced LO output or an aberrant trapping of lymphocytes in Cxcl12-expressing organs as a consequence of enhanced sensitivity to Cxcl12. We first enumerated the BM sinusoidal lymphocytes using *in vivo* anti-CD45 Ab labeling to selectively stain hematopoietic cells in the vascular compartment (Pereira et al., 2009). This measurement is thought to be proportional to the BM exit rate, although we cannot rule out that CD45⁺ BM cells also include a few cells entering the BM through sinusoids. As shown in Fig. 4B, a low number of pro-/pre-B cells were labeled by the anti-CD45 Ab in the BM from WT and mutant mice, as they were likely predominant in the parenchyma. Interestingly, the number of sinusoidal immature B cells was significantly decreased in the BM of Cxcr4⁺¹⁰¹³ and Cxcr4^{1013/1013} mice compared to the BM of WT mice (Fig. 4B), which is consistent with a defect in immature B-cell egress from the BM parenchyma into the sinusoids in mutant mice. A sizable pool of mature recirculating B and T lymphocytes was recovered from the sinusoids of WT mice, and to

a lesser extent in mutant mice, except for $Cxcr4^{1013}$ -expressing $CD4^+$ T cells. Those phenotypes in mutant mice could result from at least two mechanisms: impaired migration of mature lymphocytes from the parenchyma to the sinusoidal compartment of the BM, a process required for exit, or enhanced blood-to-BM trafficking of these cells through sinusoids.

Further, to explore their homing capacity, we labeled purified $CD4^+$ T or B cells from the spleen of WT and $Cxcr4^{+/1013}$ mice with fluorescent dyes, adoptively co-injected them into WT recipients and quantified by flow cytometry the contribution of cells present in the BM and LNs 15 h or 2 d after injection. We detected that $Cxcr4^{+/1013}$ mature lymphocytes trafficked to the BM more efficiently than WT controls (Fig. 4C). This was observed regardless of time point and not extended to LNs. These findings imply that Cxcr4 desensitization is required for adequate homing of mature recirculating T and B cells in the BM and then for their release to the blood. Supporting this assumption, we found an increased number of BM $CD4^+$ T cells in mutant mice compared with WT mice as well as a major contribution of mutant donor hematopoietic cells to the BM $CD4^+$ T-cell compartment in BM-chimeric mice (Fig. 4D). Similar findings were observed for mature recirculating B cells (Fig. 2A and 3D).

Taken together, these results indicate that impaired Cxcr4 desensitization altered egress of newly generated immature B cells from the BM into the blood and conversely, forced homing and retention of mature peripheral B and T cells to the BM parenchyma.

Impaired egress of $Cxcr4^{1013}$ -expressing lymphocytes from lymph nodes

Secondary LOs of $Cxcr4^{+/1013}$ mice exhibited a disorganized architecture together with abnormal lymphocyte compartmentalization characterized by a reduction of primary B-cell follicles in the spleen and their absence in LNs mirrored by an unfurling of the T-cell zone (Suppl. Fig. 1) (Balabanian et al., 2012). In the spleen, $Cxcr4^{1013/1013}$ mice displayed a more severe hypoplasia than $Cxcr4^{+/1013}$ mice (Fig. 5A). By contrast, there were no major abnormal phenotypes in LNs from these mice (Suppl. Fig. 1). According to their minor contribution to the peripheral blood of BM-chimeric mice (Fig. 3D), we found significantly fewer $Cxcr4^{+/1013}$ or $Cxcr4^{1013/1013}$ T and B cells in the spleen and LNs of mixed chimeras (Fig. 5B). Histologic analyses further revealed grossly normal secondary LO architecture in recipient mice (Fig. 5C). $Cxcr4^{1013}$ -expressing T cells adequately compartmentalized together with WT cells within the spleen white pulp and the LN T-cell zone in the paracortical area. B cells from mutant mice segregated in spleen primary follicles but did not mix with WT cells and rather formed isolated clusters in close contact with the T-cell zone (Fig. 5C). In LNs, $Cxcr4^{+/1013}$ and WT B cells co-localized within primary follicles, while $Cxcr4^{1013/1013}$ B cells were absent from those structures in recipient BM-chimeric mice. These findings indicate that the weak reconstitution of spleen and LN lymphocyte compartments by mutant donor cells reflects the peripheral blood (Fig. 3D) and supports the notion, as suggested by adoptive transfer assays (Fig. 4C), that LN entry through high endothelial venules (HEVs) is not defective for $Cxcr4^{1013}$ -expressing lymphocytes.

Lymphocyte exit from LNs occurs *via* medullar sinusoids that connect to efferent lymphatics. By using *in vivo* anti-CD45 Ab labeling procedure to discriminate parenchymal and sinusoidal cells in LNs (Mayol et al., 2011), we observed that

sinusoidal B and T cells from mutant mice were strongly decreased compared with those of WT mice (Fig. 5D), indicating that Cxcr4¹⁰¹³-expressing lymphocytes had a reduced capacity to exit LNs. While impaired exit could account for LN B- and T-cell accumulation in Cxcr4⁺¹⁰¹³ mice, it cannot explain LN normalization in Cxcr4^{1013/1013} mice. We thus hypothesized that lymphocytes inappropriately retained in LNs might undergo inadequate proliferation or death. We performed cleaved caspase-3 and BrdU labeling to assess the level of apoptosis and proliferation in secondary LOs of mutant mice. Although the fraction of lymphocytes labeled with BrdU was closely similar in LNs from WT and Cxcr4⁺¹⁰¹³ mice, B and T cells showed significantly higher levels of cleaved caspase-3 staining in Cxcr4⁺¹⁰¹³ mice than in WT ones (Fig. 5E), indicating an increase incidence of cell death without alteration in cell proliferation. This could be the consequence of abnormal lymphocyte retention in LNs. Conversely, in LNs from Cxcr4^{1013/1013} mice, there was a higher percentage of proliferating lymphocytes compared with WT ones, while no survival defect was observed (Fig. 5E). Of note, the residual splenic B and T cells of mutant mice exhibited a high turnover rate, *i.e.* increase in both proliferation and apoptosis, which was more marked among Cxcr4^{1013/1013} lymphocytes (Fig. 5E). This suggests that neither impaired proliferation nor increased apoptosis account for splenic hypoplasia in mutant mice.

Collectively, these data indicate that Cxcr4 desensitization is required for efficient lymphocyte egress from LNs, while this process appears to be dispensable in the spleen, and suggest that fine-tuning Cxcr4 signaling regulates lymphocyte viability within secondary LOs.

Increase of antigen-specific plasma cells after protein vaccination in $Cxcr4^{+/1013}$ mice

In spite of severe B-cell lymphopenia and spleen hypoplasia, serum natural IgM and IgG levels were found to be higher in non-manipulated mutant mice than in WT ones (Suppl. Fig. 2A). This was even amplified in $Cxcr4^{1013/1013}$ mice. Combinatorial diversity analyses of mouse immunoglobulin heavy chain did not reveal a restricted B-cell repertoire at baseline in spleen from mutant mice (Suppl. Fig. 2B). Since $Cxcr4^{+/1013}$ mice showed significant differences in peripheral LN B- and T-cell populations when compared to WT mice at steady state (Fig. 5 and Suppl. Fig. 1), we assessed their ability to mount a mature Ab response to TD Ag. WT and $Cxcr4^{+/1013}$ littermates were subcutaneously immunized either with hen egg lysozyme (HEL) or Ovalbumin (OVA) emulsified in Sigma adjuvant system (SAS). As expected, unchallenged and HEL/SAS immunized mice produced extremely low to none circulating OVA-specific Abs as detected by ELISA (Fig. 6A). However, both WT and $Cxcr4^{+/1013}$ mice produced comparable serum titers of OVA-specific IgG 14 d after primary OVA/SAS immunization and 5 d after secondary immunization (boost). This was associated with the formation of PNA⁺ GCs, which are microanatomical sites of B-cell expansion, hypermutation and selection (McHeyzer-Williams et al., 2012), at d 14 after priming and d 5 after boosting in WT mice (Fig. 6B). Of note, PNA⁺ GC structures were observed in LNs from mutant mice, but they displayed disorganized architecture, *i.e.* absence of primary B-cell follicles mirrored by an unfurling of the T-cell zone, like in unchallenged mice.

As Cxcr4 signals are key for the discrimination between centroblast-rich dark zone and centrocyte-rich light zone during the GC reaction (Victoria et al., 2012), we next

asked whether the gain-of-Cxcr4-function mutation could modify local B-cell responses in dLNs. After OVA/SAS immunization, total CD19⁺ B cells were significantly increased in dLNs from WT and *Cxcr4*^{+/*1013*} mice at d 14 after priming and d 5 after boosting when compared to unchallenged mice (Fig. 6C, left panel). Further, we detected OVA-specific B cells, which bind specifically to FITC-conjugated OVA (Suppl. Fig. 2C), and found a significant population of OVA-specific GC B cells and PC that emerged in dLNs of immunized WT mice 14 d after priming and 5 d post-boost (Fig. 6C). In mutant mice, we observed a significant increase in both OVA-specific GC B cells and PC after priming and boost. We also enumerated OVA-specific (IgG) ASCs by ELISPOT assays in dLNs and found a greater number of OVA-ASCs in immunized *Cxcr4*^{+/*1013*} mice when compared to WT mice regardless of the time point (Fig. 6D). Mature Ab response is highly dependent on CD4⁺ Tfh cells (Fazilleau et al., 2009). This prompted us to investigate whether the Tfh-cell subset could account for the increased production of OVA-specific PC in mutant mice. Total CD4⁺ T cells were increased in dLNs after OVA/SAS immunization when compared to unchallenged WT and mutant mice (Fig. 6E, left panel). OVA-specific Tfh cells were detected using OVA-I-Ab specific tetramer together with an anti-Cxcr5 mAb (Suppl. Fig. 2D). In WT mice, OVA-specific Tfh cells were found 14 d after priming and further increased 5 d after boost (Fig. 6E, right panel). A comparable profile of OVA-specific Tfh appearance was observed in immunized *Cxcr4*^{+/*1013*} mice, except at 14 d after priming where those cells were significantly reduced compared with WT mice.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Overall, these data suggest that TD B-cell response to protein Ag after secondary challenge is boosted in *Cxcr4*^{+/*1013*} mice at the B-cell level and cannot be attributed to a modification of their cognate regulators, namely Tfh cells.

DISCUSSION

Our current understanding of the role of CXCR4 in regulating lymphocyte development and peripheral compartmentalization is based on data generated from mice deficient in *Cxcr4*, *Cxcr4*^{-/-} fetal liver BM chimeras or eventually gene-targeted mice in which *Cxcr4* was selectively inactivated in the B- or T-cell lineage (Ma et al., 1998; Nie et al., 2004; Tachibana et al., 1998; Tramont et al., 2010). These studies identified *Cxcr4* as a positive regulator of lymphopoiesis. Here, we investigated the impact on lymphocyte homeostasis of a gain-of-*Cxcr4*-function mutation, which encodes for a C-tail truncated desensitization receptor with normal membrane expression. By combining biochemical, mixed BM chimera, *in vivo* labeling and functional approaches, we revealed that fine-tuning *Cxcr4* desensitization intrinsically controls lymphocyte development, peripheral trafficking and function. In primary LOs, proper *Cxcr4*-mediated signaling regulates DN2-to-DN3 and pro-B-to-pre-B developmental checkpoints and coordinates the release of immature BM B cells and mature LN lymphocytes into blood. Conversely, it drives homing and retention of mature recirculating B and T cells in the BM parenchyma. Despite the absence of primary B-cell follicles in LNs, mutant mice were able to produce efficient humoral responses as illustrated by the acquisition of GC phenotype by B cells, appearance of Tfh cells and high numbers of switched TD Ag-specific PCs. These data provide evidence that the C-tail domain in *Cxcr4*-mediated signaling is pivotal for lymphocyte homeostasis.

We previously reported that immunodetection of precipitated *Cxcr4* receptors revealed only one similar band in LO lysates from WT, *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ and *Cxcr4*^{1013/1013} mice (Balabanian et al., 2012). We now provided evidence that membrane levels of}

Cxcr4 were in the same range between spleen lymphocytes from WT, $Cxcr4^{+/1013}$ and $Cxcr4^{1013/1013}$ mice (Fig. 1A). Moreover, we showed that spleen lymphocytes from $Cxcr4^{+/1013}$ mice displayed a gain-of-Cxcr4-function (*i.e.* increased chemotaxis) together with an impaired Cxcr4 internalization upon Cxcl12 stimulation (Fig. 1B and C). Although mutant and WT receptors cannot be distinguished in size, these findings indicate a normal synthesis, stability and translation of the mutant *Cxcr4* mRNAs and subsequently a normal membrane anchoring and expression of the mutant protein. The impaired down-regulation of Cxcr4 upon Cxcl12 stimulation that characterized $Cxcr4^{+/1013}$ cells is surprising if one considers that both WT and mutant *Cxcr4* alleles are equally expressed. In light of the recent crystal structure of CXCR4 that has corroborated the notion of CXCR4 dimerization (Wu et al., 2010), one can speculate that the functional prevalence of the mutant $Cxcr4^{1013}$ receptor involves a dominant effect through heterodimer formation with its WT counterpart. Supporting this assertion, Cxcr4 internalization was similarly impaired in spleen B cells from $Cxcr4^{+/1013}$ and $Cxcr4^{1013/1013}$ mice. Other endocytosis-resistant GPCRs have been reported to prevent endocytosis by the formation of heterodimers (Roumy et al., 2007). This could rely on the rate, kinetic and magnitude of β -arrestin recruitment to the C-tail domain of each protomer within the dimer (Pal et al., 2013; Shukla et al., 2013). Finally, we showed that the $Cxcr4^{1013}$ receptor endowed with differential signaling capacities depending on its heterozygous *versus* homozygous status, as revealed by Erk1/2 activation and a downstream signaling event such as chemotaxis (Fig. 1C and D). This supports a model in which $Cxcr4^+$ and $Cxcr4^{1013}$ receptors form homo/hetero-dimer and respond to Cxcl12 as units that undergo conformational changes and behave differentially for signaling.

We previously revealed a reduced absolute number of pro/pre-B cells and immature B cells in the BM of *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ mice (Balabanian et al., 2012). Here, we extended these findings by showing that the B-cell lineage is altered from the pre-B cell stage in *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ mice, while the BM of *Cxcr4*^{1013/¹⁰¹³ mice exhibited earlier defects in B cell ontogeny, as illustrated by the significant reduction in pro-B cells (Fig. 2A). This indicates that proper Cxcr4 signaling is required for optimal pro-B-to-pre-B stages progression. As Cxcl12 was originally identified as a pre-B-cell stimulating growth factor (Nagasawa et al., 1996), one can speculate that Cxcr4 hyperactivity would result in increased pre-B cell proliferation. Surprisingly, mutant pre-B cells proliferated less robustly than WT ones, and this was mirrored by an enhanced apoptosis (Fig. 2C). Such phenomenon could rely on the impaired maintenance and/or compartmentalization of HSCs or early lymphoid progenitors into specialized BM niches as recently reported by Ding and coworkers (Ding and Morrison, 2013). The number of sinusoidal pro-/pre-B cells tended to increase in the BM of *Cxcr4*^{1013/¹⁰¹³ mice (Fig. 4B), suggesting a disturbed and likely perivascular compartmentalization of these precursors into the BM microenvironment. An enhancement of Cxcl12-promoted quiescence of early precursors could also account for the alteration of early B-cell development in mutant mice (Nie et al., 2008). Competitive mixed BM chimeras raised somewhat puzzling results as the B-cell lineage dominantly derived from *Cxcr4*¹⁰¹³-expressing donor BM cells in host mice (Fig. 3C and D). However, our findings were reminiscent to those highlighting Cxcr4 as pivotal in mediating both homing and retention of HSPCs in the BM (Lapid et al., 2008) and corroborated the advantage of a WS-linked C-tail truncating *CXCR4* mutation to human HSCs for BM engraftment in a NOD/SCID mouse xenotransplant model (Kawai}}}}

et al., 2007). Thus, in a competitive environment, impaired Cxcr4 desensitization might favor homing and/or retention of early B-cell progenitors at the expense of their WT counterparts in certain BM niches.

In this paper, we show that proper Cxcr4 desensitization on developing BM B cells is necessary for the normal representation of immature B cells in the peripheral blood. The defect in BM lymphopoiesis process clearly contributes to their peripheral deficiency. This could also be explained by a reduced BM output, as immature B cells transit from the parenchyma to the sinusoidal compartment before being released into the blood (Pereira et al., 2009). We found that sinusoidal immature B cells were markedly decreased in the BM of mutant mice (Fig. 4B), indicating a reduced capacity of these cells to exit the BM. As a sizable pool of such population emerges in the BM with an increased apoptosis pattern (Fig. 2C), we propose that immature B cells retained in the BM as a consequence of an egress defect could be prone to cell death. The sphingosine 1-phosphate receptor type 1 (S1P1) is required for the release of immature B cells from the BM (Allende et al., 2010). This suggests the possibility that coordinated changes in Cxcr4 and S1P1 responsiveness govern immature B-cell trafficking. Examination of S1P1 expression and/or function in immature B cells that express a desensitization-resistant Cxcr4 will help to delineate this issue. The intriguing finding that the number of mature B cells is preserved in the BM of mutant mice despite reduced precursors (Fig. 2A) suggests a BM-biased tropism for these recirculating cells. Several convergent observations support this notion. First, the normal or slight increased cell proliferation, which is counterbalanced by enhanced apoptosis, cannot solely account for their normal representation (Fig. 2C). Second, mature recirculating B cells mostly derived from

Cxcr4¹⁰¹³-expressing BM cells in mixed chimeras (Fig. 3D). Third, in steady-state mutant mice, this population was severely decreased in the bloodstream (Fig. 4A). Fourth, our homing assays clearly showed that after 15h the BM of recipient mice contained five-fold more Cxcr4⁺¹⁰¹³ mature B cells than WT ones (Fig. 4C). Lastly, the number of sinusoidal mature B cells was significantly decreased in the BM of mutant mice compared to WT mice (Fig. 4B). Altogether, these findings extend previous observations that proper Cxcr4 desensitization is required for the homing of mature B cells to the BM (Henderson et al., 2010; Nie et al., 2004) and then for their appropriate positioning into the sinusoidal niche (Pereira et al., 2009).

Thymocyte maturation is coupled with chemokine-dependent migration from the cortex to the medulla that constitutes a critical step for the selection of the T-cell repertoire (Takahama, 2006). Recent works have reported a key role for the Cxcl12/Cxcr4 signaling in the localization of mouse and human developing thymocytes (Halkias et al., 2013). In mice, Cxcr4 seems to function as a co-stimulator with the pre-TCR to provide survival and proliferation signals that are required during β -selection (Tramont et al., 2010). We previously showed that all thymic cell subsets, from progenitors to mature SP thymocytes, were reduced in Cxcr4⁺¹⁰¹³ mice despite a preserved thymic architecture (Balabanian et al., 2012). Here we showed that DN3 thymocytes were significantly reduced in Cxcr4⁺¹⁰¹³ mice, while they exhibited increased proliferation (Fig. 2B and C). These findings strongly suggest that the defect in early T-cell development that likely occurs during the DN2-to-DN3 transition could rely on the inappropriate positioning of immature thymocytes in the outer cortex or sub-capsular area rather than on impaired proliferation or survival signals. In Cxcr4^{1013/1013}

mice, the defective step could be earlier as DN1 thymocytes were barely detectable and this was not correlated with decreased cell survival or proliferation. This might be the consequence of a defective BM-to-thymus trafficking of early T lineage precursors (ETPs) as supported by previous works (Calderon and Boehm, 2011). Considering the high level of Cxcl12 expression in the BM combined to the gain-of-Cxcr4-function carried by hematopoietic cells, one can speculate that ETPs accumulate in the BM. Their abnormal trapping into unexplored Cxcl12-expressing organs cannot be ruled out. The enhanced cell death in DN2 and DN3 thymocytes from *Cxcr4*^{1013/1013} mice further underscored that fine-tuning Cxcr4 desensitization is required for optimal proliferation and survival of DN thymocytes as they undergo β -selection. Unexpectedly, we observed an increased number of mature CD4⁺ T cells in the BM of mutant mice (Fig. 4D). As *Cxcr4*¹⁰¹³-expressing donor hematopoietic cells predominantly contributed to the BM CD4⁺ T-cell population in BM-chimeric WT as well as *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ hosts (Fig. 4D and not shown), the preferential BM localization is likely a T-cell intrinsic defect. At least two mechanisms could account for CD4⁺ T-cell accumulation in the BM. First, similarly to mature B cells, CD4⁺ T cells could be attracted and then retained in the BM as a result of their increased responsiveness to Cxcl12. Indeed, we showed after adoptive co-transfer that *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ CD4⁺ T cells trafficked to the BM more efficiently than WT controls in WT and *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ recipients (Fig. 4C and not shown). Second, the BM environment by secreting tropic factors such as Cxcl12 and IL-7 (Tokoyoda et al., 2009) could promote increased proliferation and/or survival of *Cxcr4*¹⁰¹³-expressing CD4⁺ T cells as a result of enhanced signaling.

Homing and positioning of transitional B cells in the spleen are governed by Ccr7 and Cxcr5 (Henderson et al., 2010; Ohl et al., 2003). The reported Cxcl12 expression in the red pulp (Hargreaves et al., 2001) could make the spleen as a site where mature mutant lymphocytes abnormally lodge and accumulate. This was not the case as mutant mice exhibited spleen follicular hypoplasia that followed a mutated allele dose-dependent pattern (Fig. 5A). Because spleen entry is not defective for Cxcr4¹⁰¹³-expressing lymphocytes (unpublished data) and that splenic B and T cells of mutant mice exhibited locally a high turnover rate (Fig. 5E), one can consider that splenic lymphocyte reduction reflected merely the circulating lymphopenia. The requirements for lymphocyte entry through HEVs into LNs are well known and involve the dominant receptor Ccr7 and its ligands. The Cxcl12/Cxcr4 axis appears to contribute partially to this process (Okada et al., 2002). In line with this, we detected no competitive advantage conferred by the Cxcr4¹⁰¹³ mutation to B and T cells for LN homing 15h after adoptive co-transfer (Fig. 4C) or in recipient BM chimeric mice (Fig. 5B and C). These findings indicate that the gain-of-Cxcr4-function affected neither the expression nor the activity of Ccr7 *in vivo*, thus extending our previous *in vitro* observations made in mouse- and patient-derived cells (Balabanian et al., 2012; Balabanian et al., 2005). In contrast, impaired Cxcr4 desensitization disturbed lymphocyte egress through cortical sinus from LNs, a process reported to occur in an S1P1-dependent manner (Cyster, 2005). Indeed, the number of sinusoidal mature lymphocytes was significantly decreased in LNs from mutant mice compared to WT mice (Fig. 5D). The exact mechanism remains to be determined but it could involve interplay between Cxcr4 and S1P receptor signals dictating either retention or exit from LNs. Studies on LNs and Peyer's patches (PPs) have shown that Ccr7 and

Cxcr5 constitute points of retention regulation in LNs and PPs respectively (Schmidt et al., 2013). Our data further indicate that Cxcr4 needs to be desensitized to allow efficient lymphocyte egress from LNs.

We wondered whether altered lymphocyte compartmentalization in LNs could have an impact on an emerging adaptive immune response. Thus, we estimated the TD B-cell response to the protein OVA after primary or secondary challenge in WT and *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice. We found no difference in the circulating OVA-specific Abs in primary or secondary responses (Fig. 6A). In contrast, more OVA-specific B cells, *i.e.* GC B cells and ASCs, were observed in dLNs of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (Fig. 6C). This increase was shown to be B-cell intrinsic and cannot be attributed to their cognate regulators, namely Tfh cells. Given the role for CXCR4 in stabilizing the T cell-Ag presenting cell immunological synapse (Kallikourdis et al., 2013), we cannot exclude an impairment of such process during the initial steps of T-cell priming in mutant mice. One possibility might just reflect the lack of egress of B and T cells from LNs as discussed above. We actually favor the hypothesis that the LN architecture of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice itself could assign for this increase in TD B-cell response. Indeed, GC structures could be observed in dLNs of immunized *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice (Fig. 6B). However, in contrast to our observations in WT LNs and accordingly to what found at steady state (Suppl. Fig. 1), the whole LN of mutant animals resembled a huge B follicle where B and CD4⁺ T cells interact. Ultimately, this organization could favor the help to B cells by CD4⁺ T cells through non-cognate signals such as IL-21 that would support B-cell survival and/or proliferation (Zotos et al., 2010) and/or by increasing T cell-B cell interactions. Somehow surprising, we observed a local increase in TD B-cell responses in mutant mice, while patients with

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

WS were shown to respond less efficiently to protein vaccination (Handisurya et al., 2010; Mc Guire et al., 2010). One could claim that the increase of Ag-specific B-cell responses is only local and that it actually reflects a defect of long-lived PC migration to the BM and/or memory B-cell recirculation. This would account for the decrease in vaccine efficiency in patients.

In summary, this study underscores that fine-tuning of CXCR4 signal strength is required for optimal trafficking, egress and function of lymphocytes. This should be taken account in the development of future Cxcr4-based therapies.

MATERIALS AND METHODS

Mice, chimeras, BrdU and sinusoidal labeling

$Cxcr4^{+/1013}$ mice were generated and bred as described (Balabanian et al., 2012). $Cxcr4^{1013/1013}$ were obtained by crossing heterozygous mice. $Cxcr4^{1013/1013}$ mice were born at a lower Mendelian frequency than expected: $Cxcr4^{+/+}$ (WT): 54.5%, $Cxcr4^{+/1013}$: 27.7% and $Cxcr4^{1013/1013}$: 17.8% (n = 253). We used 8-12-week-old female mice littermates unless specified. Adult Boy/J (CD45.1⁺), $Cxcr4^{+/1013}$ or $Cxcr4^{1013/1013}$ (C57Bl/6J background, CD45.2⁺) were bred into our animal facility under 12-hours light/dark cycle, specific-pathogen-free conditions and feed *ad libidum*. For generation of BM-mixed chimeras, 1.5×10^6 total BM cells from either $Cxcr4^{+/1013}$ or $Cxcr4^{1013/1013}$ were mixed with 1.5×10^6 total BM cells from adult WT Boy/J and transferred into either Boy/J or $Cxcr4^{+/1013}$ mice that had been exposed to two rounds of 5.5 Gy separated by 3 h. Chimeras were analyzed at least 11 wk after reconstitution. BrdU was injected (2 mg) intravenously (i.v.) daily 4 d before immunophenotyping of tissues according to manufacturer instructions (BD Biosciences). All experiments were performed in accordance with protocols approved by the CETEA-CEA DSV IdF (C2EA-44, Animal Care and Use Committee, Fontenay-Aux-Roses, France). Sinusoidal cells labeling was performed as previously described (Mayol et al., 2011) by injecting mice i.v. with 1 μ g of anti-CD45-Phycoerythrin (PE) (BD Pharmingen) in 200 μ L of PBS for 2 min. Mice were then immediately euthanized and tissues prepared as following.

Samples isolation

Isolation of organs was performed upon anesthesia with intraperitoneal (i.p.) injection of Ketamine (100 mg/kg)/Xylazine (10 mg/kg, both purchased at Centravet). The peripheral blood was collected by cardiac puncture and 10 μ L of blood were added to 90 μ L of PBS acetic acid 3% methylene blue 10% for counting. Red blood cells lysis was performed after Ab staining using OptiLyse®C (Beckman-Coulter) according to manufacturer protocol. The BM was harvested from femurs by flushing with ice-cold PBS fetal calf serum (FCS) 10%. LNs, thymus, and spleen were gently mashed on a 70- μ m nylon mesh and cells recovered were then suspended in PBS FCS 2%. Spleen cells were suspended in PBS FCS 2% after 2 min in 1 mL Ammonium-Chloride-Potassium buffer. Cells harvested from tissues were either directly immunophenotyped or left incubated at 37°C for 60 min in RPMI 20 mM HEPES bovine serum albumin (BSA) 0.5% (Euromedex) before performing chemokine receptor staining and functional assays.

Western blot

1×10^6 splenic B cells magnetically isolated with the negative B-cell sorting kit (Miltenyi Biotec) on an Automacs Cell Separator (Miltenyi Biotec) were serum-starved overnight in RPMI, simulated with 100 nM CXCL12 (R&D Systems) and lysed with RIPA buffer (Sigma-Aldrich) Triton X100 1%. Equivalent amounts of protein were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Nonspecific binding was prevented by incubating the membranes with blocking buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5% skim milk powder) for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated overnight at 4°C with specific primary anti-p44/42 (137F5) or anti-phospho-p44/42

MAPK (Thr202/Tyr204) Ab (Cell Signaling Technology™). Membranes were then incubated with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary Ab (GE Healthcare) for 1 h at room temperature, placed against film (GE Healthcare) and the bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer). Chemi-Smart 5000 equipped with Bio-Profil software (UVP) was used for densitometric analysis. All bands were normalized with respect to total p44/42 MAPK (Cell Signaling Technology™).

Immunostaining

For immunohistochemistry, fixed inguinal LN tissues were embedded in low-melting point paraffin. Sections were deparaffinized, rehydrated and then treated with heated sodium citrate buffer (0.01 M, pH6). Slides were incubated with following Abs: monoclonal rat anti-mouse CD45R/B220 (clone RA3-6B2, CliniSciences), polyclonal rabbit anti-human/mouse CD3 (DAKO), polyclonal rabbit anti-mouse Lyve-1 (AngioBio) or monoclonal rat anti-mouse Peripheral LN Addressin Carbohydrate Epitope/CD62L (clone MECA-79, BD Biosciences) in PBS BSA 3% overnight at 4°C. A HRP-based system (Invitrogen) was used for detection. Sections were then counterstained with hematoxylin (Thermo Fischer). Images were obtained with a Leica DMLA microscope equipped with standard optic 10× objectives lens with numerical aperture 0.75, at the indicated magnifications, digitized with a Sony 3CCD color video camera (Leica) and acquired with Cell F software (Olympus).

For immunofluorescence, LNs and spleen were embedded in OCT medium (TissueTek). Cryosections (5 µm) were treated with acetone for 5 min and PBS triton

X100 0.5% for 4 min, washed twice with PBS and blocked in a solution of PBS BSA 5% for 1 h. Slides were incubated with following Abs: monoclonal rabbit anti-mouse pan-T cell marker CD3 (clone EPR4517, Epitomics, Burlingame, CA) or monoclonal rat anti-mouse IgD (clone 11-26c, eBioscience) overnight at 4°C and with monoclonal rat anti-mouse pan-B cell marker CD45R/B220 (clone RA3-6B2, BD Biosciences) and biotinylated monoclonal mouse anti-mouse CD45.1 (clone A20, Clinisciences), or monoclonal rat anti-mouse CD4 (clone RM4-5, eBiosciences) labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and biotinylated peanut agglutinin (PNA, Vector laboratories) for 1 h at room temperature. Slides were washed twice with PBS and incubated with the appropriate secondary Ab (Invitrogen): anti-rabbit labeled with Alexa Fluor® (AF) 488, anti-rat labeled with AF 488 or AF 594, anti-FITC labeled with AF 488 or streptavidin labeled with AF 594 or allophycocyanin (APC) for 1 h at room temperature. Mounting was done using Vectashield medium (Vector Laboratories) that included the DAPI fluorochrome for nuclear staining. Slides were scanned using a NanoZoomer Digital Pathology system 2×, 10× or 30× objective lens with numerical aperture 0.75 (Hamamatsu Photonic).

Flow cytometry analyses

Analyses were carried out on an LSRII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) using the following mAbs: CD3 (clone 145-2C11, hamster IgG1), CD4 (clone RM4-5, rat IgG2a), CD8 (clone 53-6.7, rat IgG2a), CD62L (clone MEL-14, rat IgG2a), CD25 (clone PC61, rat IgG1), CD44 (clone IM7, rat IgG2b), CD43 (clone S7, rat IgG2a), CD45 (clone 30-F11, rat IgG2b), CD45.1 (clone A20, mouse IgG2A), CD45.2 (clone 104, mouse

IgG2a), CD95/Fas (clone Jo2, hamster IgG2), CD19 (clone 1D3, rat IgG2a), CD45R/B220 (clone RA3-6B2, rat IgG2a), CD21/C35 (clone 7G6, rat IgG2b), CD23 (clone B3B4, rat IgG2a), IgM (clone II/41, rat IgG2a), IgD (clone 11-26, rat IgG2a), Cxcr4 (clone 2B11, rat IgG2b), Cxcr5 (clone 2G8, rat IgG2a) and Ccr7 (clone 4B12, rat IgG2a). mAbs were conjugated to FITC, PE, APC, AF 700, PE-Cyanin (Cy) 7, efluor 450, V500, AF 647, APC-efluor 780, peridinin chlorophyll protein (PerCp), PerCp-Cy5,5 or pacific blue and purchased at BD Biosciences or eBioscience. OVA-FITC conjugate was purchased at Invitrogen. PE-coupled OVA-specific tetramer (I-A(b), sequence : AAHAEINEA) was kindly provided by the NIH tetramer facility (Atlanta, GA).

Immunization

Mice were immunized with either OVA (Sigma-Aldrich) or HEL (Sigma-Aldrich) adjuvanted with SAS (Sigma-Aldrich), a monophosphoryl lipid-based adjuvant, at a concentration of 0.5 mg/mL subcutaneously (2×100 µL) according to manufacturer protocol. Blood and periaortic LNs (pLNs) were harvested and analyzed 14 d after primary challenge or 5 d after boost occurring 42 d after initial challenge.

ELISA, ELISPOT and BCR diversity analyses

Sera were harvested upon mice bleeding by retro-orbital puncture under anesthesia and total levels of IgM, IgA, IgG and anti-OVA IgG titers were determined by ELISA as previously described (Balabanian et al., 2012). Enumeration of OVA-specific ASCs was performed by ELISPOT assays from 5×10^5 pLN cell suspension as previously described (Pelletier et al., 2010) using OVA at 20 µg/mL for coating and biotinylated goat anti-

mouse IgG (Cliniscience) for revelation. The reaction was stopped with water and analyzed with an AID Elispot Reader ELR03 (Autoimmun Diagnostika). B-cell repertoire combinatory diversity was assessed from Lympholyte M (Tebu-bio)-isolated spleen lymphocytes using ImmunTraCkeR[®] and Immun'Ig[®] assays on a IFS3 station as developed by ImmunID[®] (Marodon et al., 2009).

Homing assays

Splenic B and CD4⁺ T cells were magnetically isolated using positive CD4⁺ or negative B-cell sorting kit (Miltenyi Biotec) and then labeled with 2 μM of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes) or PKH26 red linked fluorescent protein (Invitrogen) in RPMI containing 2% FCS for 20 min at 37°C. A 200 μL of 1:1 mix of labeled cells (4×10⁶ cells) was injected i.v. to WT recipient. After 15 h or 2 d, BM and LNs were harvested and the homing pattern of lymphocytes was evaluated as follows: $\{[(\text{number of } Cxcr4^{+/1013} \text{ cells detected})/(\text{number of } Cxcr4^{+/1013} \text{ cells injected})]/[(\text{number of WT cells detected})/(\text{number of WT cells injected})]\}$.

Functional assays

Chemotaxis, chemokine receptor internalization and apoptosis measurement assays were performed as described previously (Balabanian et al., 2012). Recombinant mouse chemokines, namely Ccl21/6Ckine, Cxcl12/SDF-1, Cxcl13/Blc (all from R&D Systems), and AMD3100 (Sigma-Aldrich) were used at the indicated concentrations.

Statistical analysis

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Data are expressed as means \pm SD. The statistical significance between groups was evaluated using the 2-tailed Student *t* test.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M-L. Aknin and E. Brotin (Univ. Paris-Sud, INSERM UMR_S996, Clamart, France) and L. Bouchet-Delbos, H. Tharinger and H. Gary (Plateforme d'Immunomonitorage, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Clamart) for their technical assistance. The following tetramer was obtained through the NIH Tetramer Facility (Atlanta, GA): PE-coupled OVA-specific tetramer (I-A(b), sequence: AAHAEINEA). We thank ImmunID (Grenoble, France) for combinatorial diversity analyses of mIgH. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant number 2010 JCJC 1104 01). VB, CF, FG and KB are members of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33) under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01. VB and CF are fellowship recipients from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the DIM Biothérapies, respectively. PH is a grant recipient from the FRM. NF is supported by AVENIR INSERM, Association pour la Recherche sur le Cancer (AO 2009), la Ligue Nationale Contre le Cancer, FRM, Conseil Régional Midi-Pyrénées, Institut National contre le Cancer (PLBIO10-195) and International Re-Integration Grant Marie Curie. AS is a fellowship recipient from la Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors have no conflicting financial interests.

REFERENCES

- Allende, M.L., G. Tuymetova, B.G. Lee, E. Bonifacino, Y.P. Wu, and R.L. Proia. 2010. SIP1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J. Exp. Med.* 207:1113-1124.
- Balabanian, K., E. Brotin, V. Biajoux, L. Bouchet-Delbos, E. Lainey, O. Fenneteau, D. Bonnet, L. Fiette, D. Emilie, and F. Bachelierie. 2012. Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood.* 119:5722-5730.
- Balabanian, K., B. Lagane, J.L. Pablos, L. Laurent, T. Planchenault, O. Verola, C. Lebbe, D. Kerob, A. Dupuy, O. Hermine, J.F. Nicolas, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, P. Bordigoni, F. Baleux, F. Le Deist, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelierie. 2005. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood.* 105:2449-2457.
- Calderon, L., and T. Boehm. 2011. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:7517-7522.
- Cyster, J.G. 2005. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 23:127-159.
- Ding, L., and S.J. Morrison. 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* 495:231-235.
- Dotta, L., L. Tassone, and R. Badolato. 2011. Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr. Mol. Med.* 11:317-325.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Fazilleau, N., L. Mark, L.J. McHeyzer-Williams, and M.G. McHeyzer-Williams. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*. 30:324-335.

Gulino, A.V., D. Moratto, S. Sozzani, P. Cavadini, K. Otero, L. Tassone, L. Imberti, S. Pirovano, L.D. Notarangelo, R. Soresina, E. Mazzolari, D.L. Nelson, and R. Badolato. 2004. Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*. 104:444-452.

Halkias, J., H.J. Melichar, K.T. Taylor, J.O. Ross, B. Yen, S.B. Cooper, A. Winoto, and E.A. Robey. 2013. Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *J. Clin. Invest.* 123:2131-2142.

Handisurya, A., C. Schellenbacher, B. Reininger, F. Koszik, P. Vyhnanek, A. Heitger, R. Kirnbauer, and E. Forster-Waldl. 2010. A quadrivalent HPV vaccine induces humoral and cellular immune responses in WHIM immunodeficiency syndrome. *Vaccine*. 28:4837-4841.

Hargreaves, D.C., P.L. Hyman, T.T. Lu, V.N. Ngo, A. Bidgol, G. Suzuki, Y.R. Zou, D.R. Littman, and J.G. Cyster. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194:45-56.

Henderson, R.B., K. Grysz, A. Vehlow, C. de Bettignies, A. Zachacz, T. Henley, M. Turner, F. Batista, and V.L. Tybulewicz. 2010. A novel Rac-dependent checkpoint in B cell development controls entry into the splenic white pulp and cell survival. *J. Exp. Med.* 207:837-853.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Kallikourdis, M., A.E. Trovato, F. Anselmi, A. Sarukhan, G. Roselli, L. Tassone, R. Badolato, and A. Viola. 2013. The CXCR4 mutations in WHIM syndrome impair the stability of the T cell immunological synapse. *Blood*. doi:10.1182/blood-2012-10-461830
- Kawai, T., U. Choi, L. Cardwell, S.S. DeRavin, N. Naumann, N.L. Whiting-Theobald, G.F. Linton, J. Moon, P.M. Murphy, and H.L. Malech. 2007. WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4. *Blood*. 109:78-84.
- Kawai, T., and H.L. Malech. 2009. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr. Opin. Hematol.* 16:20-26.
- Lagane, B., K.Y. Chow, K. Balabanian, A. Levoye, J. Harriague, T. Planchenault, F. Baleux, N. Gunera-Saad, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelier. 2008. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*. 112:34-44.
- Lapid, K., C. Glait-Santar, S. Gur-Cohen, J. Canaani, O. Kollet, and T. Lapidot. 2008. Egress and Mobilization of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A Dynamic Multifacet Process. *In StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.91.1.
- Ma, Q., D. Jones, P.R. Borghesani, R.A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R.T. Bronson, and T.A. Springer. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:9448-9453.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Marodon, G., D. Desjardins, L. Mercey, C. Baillou, P. Parent, M. Manuel, C. Caux, B. Bellier, N. Pasqual, and D. Klatzmann. 2009. High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *Eur. J. Immunol.* 39:2136-2145.
- Mayol, K., V. Biajoux, J. Marvel, K. Balabanian, and T. Walzer. 2011. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood.* 118:4863-4871.
- Mc Guire, P.J., C. Cunningham-Rundles, H. Ochs, and G.A. Diaz. 2010. Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin. Immunol.* 135:412-421.
- McHeyzer-Williams, M., S. Okitsu, N. Wang, and L. McHeyzer-Williams. 2011. Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 12:24-34.
- Nagasawa, T., T. Nakajima, K. Tachibana, H. Iizasa, C.C. Bleul, O. Yoshie, K. Matsushima, N. Yoshida, T.A. Springer, and T. Kishimoto. 1996. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14726-14729.
- Nie, Y., Y.C. Han, and Y.R. Zou. 2008. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* 205:777-783.
- Nie, Y., J. Waite, F. Brewer, M.J. Sunshine, D.R. Littman, and Y.R. Zou. 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J. Exp. Med.* 200:1145-1156.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Ohl, L., G. Henning, S. Krautwald, M. Lipp, S. Hardtke, G. Bernhardt, O. Pabst, and R. Forster. 2003. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 197:1199-1204.
- Okada, T., V.N. Ngo, E.H. Ekland, R. Forster, M. Lipp, D.R. Littman, and J.G. Cyster. 2002. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 196:65-75.
- Pal, K., M. Mathur, P. Kumar, and K. DeFea. 2013. Divergent beta-arrestin-dependent signaling events are dependent upon sequences within G-protein-coupled receptor C termini. *J. Biol. Chem.* 288:3265-3274.
- Pelletier, N., L.J. McHeyzer-Williams, K.A. Wong, E. Urich, N. Fazilleau, and M.G. McHeyzer-Williams. 2010. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat. Immunol.* 11:1110-1118.
- Pereira, J.P., J. An, Y. Xu, Y. Huang, and J.G. Cyster. 2009. Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat. Immunol.* 10:403-411.
- Roumy, M., C. Lorenzo, S. Mazeret, S. Bouchet, J.M. Zajac, and C. Mollereau. 2007. Physical association between neuropeptide FF and micro-opioid receptors as a possible molecular basis for anti-opioid activity. *J. Biol. Chem.* 282:8332-8342.
- Schmidt, T.H., O. Bannard, E.E. Gray, and J.G. Cyster. 2013. CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 210:1099-1107.
- Shukla, A.K., A. Manglik, A.C. Kruse, K. Xiao, R.I. Reis, W.C. Tseng, D.P. Staus, D. Hilger, S. Uysal, L.Y. Huang, M. Paduch, P. Tripathi-Shukla, A. Koide, S. Koide, W.I.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Weis, A.A. Kossiakoff, B.K. Kobilka, and R.J. Lefkowitz. 2013. Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*. 497:137-141.
- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, and T. Nagasawa. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 393:591-594.
- Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6:127-135.
- Tokoyoda, K., S. Zehentmeier, A.N. Hegazy, I. Albrecht, J.R. Grun, M. Lohning, and A. Radbruch. 2009. Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity*. 30:721-730.
- Tramont, P.C., A.C. Tosello-Tramont, Y. Shen, A.K. Duley, A.E. Sutherland, T.P. Bender, D.R. Littman, and K.S. Ravichandran. 2010. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat. Immunol.* 11:162-170.
- Victoria, G.D., D. Dominguez-Sola, A.B. Holmes, S. Deroubaix, R. Dalla-Favera, and M.C. Nussenzweig. 2012. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*. 120:2240-2248.
- Wu, B., E.Y. Chien, C.D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F.C. Bi, D.J. Hamel, P. Kuhn, T.M. Handel, V. Cherezov, and R.C. Stevens. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 330:1066-1071.
- Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey. 2011. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* 11:597-606.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

Zotos, D., J.M. Coquet, Y. Zhang, A. Light, K. D'Costa, A. Kallies, L.M. Corcoran, D.I. Godfrey, K.M. Toellner, M.J. Smyth, S.L. Nutt, and D.M. Tarlinton. 2010. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207:365-378.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: The C-tail-truncated Cxcr4¹⁰¹³ receptor is expressed and functional on lymphocytes. (A) Membrane expression of Cxcr4, Cxcr5 and Ccr7 on gated spleen B (B220⁺) or T (CD3⁺) cells from WT, Cxcr4⁺¹⁰¹³ (+/1013) and Cxcr4^{1013/1013} (1013/1013) mice obtained by intercrossing heterozygous mice (n = 5). Background fluorescence is shown (bg, grey histograms). (B) Cell surface expression of Cxcr4 in spleen B cells upon exposure to 100 nM Cxcl12 or Cxcl13 at 37°C for 45 min (n = 3). No receptor internalization was found when cells were incubated at 4°C in the presence of ligand. Cxcr4 expression on spleen cells incubated in medium alone was set a 100% (dotted horizontal line). (C) Migration of spleen B cells in response to Cxcl12 (with or without 1 μM AMD3100) or 100 nM Cxcl13 or Ccl21 (n = 3). (D) Time-course of Cxcl12-induced Erk1/2 activation in sorted spleen B cells from WT, +/1013 and 1013/1013 mice (n = 3). Cells were serum-starved overnight and stimulated with 100 nM Cxcl12 for 1, 5, 15 or 30 min, or left unstimulated (0). Total (Erk) and phosphorylated Erk1/2 (P-Erk) contents in the cell lysates were assessed by immunoblot and quantified as P-Erk/Erk ratios. Results represent the means ± SD of 3 independent experiments (B-C) or are representative out of 3 to 5 independent determinations (A and D). *P < .05 and **P < .005 compared with WT cells; §P < .05 compared with +/1013 cells.

Figure 2: Reduced early B- and T-cell progenitors in mice carrying the homozygous Cxcr4¹⁰¹³ mutation. (A) Absolute numbers (mean ± SD, n = 7) of gated BM B (B220⁺) cells (left) were determined from two femurs and analyzed for the content (center) in pro-/pre-B cells (Pro/Pre, B220⁺IgM^{low}), immature (Immat., B220⁺IgM^{high}) and mature (Mat.,

B220^{high}IgM⁺) B-cell subsets and (right) in B-cell progenitors (ProB, CD43⁺) and precursors (PreB, CD43⁻). **(B)** Total thymocyte numbers (left, mean \pm SD, n = 6) were enumerated microscopically and analyzed for the content (center) in double-negative (DN, CD4⁻CD8⁻), double-positive (DP, CD4⁺CD8⁺) and single-positive (SP, CD4⁺CD8⁻ or CD4⁻CD8⁺) thymocyte subpopulations and (right) in DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44⁺), DN3 (CD25⁺CD44⁻) and DN4 (CD25⁻CD44⁻) cell subsets. **(C)** WT, +/-1013 and 1013/1013 mice (n = 3-5) were injected i.p. daily for 4 d with 2 mg BrdU. On d 5, the percentage (mean \pm SD) of BrdU⁺ BM B-cell (upper left) and DN thymocyte (upper right) subpopulations were analyzed. Caspase-3 cleavage was used to detect apoptotic BM B cells (lower left) and DN thymocytes (lower right). Results are from 3 to 5 independent experiments. **P* < .05, ***P* < .005 and ****P* < .0005 compared with WT cells; §*P* < .05 compared with +/-1013 cells.

Figure 3: Lymphocyte-autonomous defects lead to circulating lymphopenia in mice harboring the *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation. **(A)** Schematic diagram for the generation of mixed BM chimeras. **(B)** Representative flow-cytometric analysis from mixed BM chimeras described in A of total BM B cells (gated B220⁺) in a WT (CD45.1) recipient. **(C)** Contribution of CD45.2 (mean, n = 6-13) in BM B cells (B220) and thymocytes (Thym.) in either WT (CD45.1) or +/-1013 (CD45.2) recipients. **(D)** Contribution of CD45.2 (+/-1013 or 1013/1013, n = 5-13) in BM cells (left) for the content in proB, preB, immature and mature B-cell subsets, in thymocytes (middle) for the content in DN, DP, SP CD4 and SP CD8 thymocyte subpopulations, and in blood (right) CD4⁺ or CD8⁺ T cells and B220⁺ B cells of mixed BM chimeras in WT (CD45.1) recipients. Dotted

horizontal lines indicate the expected 50% chimerism between CD45.1⁺ and CD45.2⁺ donor cells. Results are from 3 to 5 independent experiments. Each circle indicates an individual mouse. **P* < .05 and ****P* < .0005 compared with WT (CD45.1⁺) donor cells.

Figure 4: Mature recirculating B and T cells accumulate in the BM of mice carrying the *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation. (A) Absolute numbers of leukocytes (left, n = 7) were determined from blood samples and analyzed for the content (right, mean ± SD) in naive (CD44⁻CD62L^{high}) and effector/memory (Eff/Mem, CD44^{high}) CD4⁺ or CD8⁺ T cells (gated CD3⁺) and immature (Immat., B220⁺IgM^{high}CD21^{low}) and mature (Mat., B220^{high}IgM^{low}CD21^{high}) B cells. Lines indicate the mean and each circle represents an individual mouse. (B) Absolute numbers (mean ± SD, n = 6) of sinusoidal (CD45⁺) Pro/Pre, immature and mature B cells and CD4⁺ or CD8⁺ T cells in the BM of WT, +/1013 and 1013/1013 mice. (C) B or CD4⁺ T cells isolated from spleens of WT and +/1013 mice were differentially labeled with fluorescent dyes and adoptively transferred (mix 1:1) to WT recipient mice. The ratios of the two populations (mean ± SD, n = 7) in the BM and inguinal LNs (iLN) were analyzed by flow cytometry 15h or 48h after injection of cells. Dotted horizontal lines indicate the 1:1 ratio of injected cells. (D) Total numbers of CD4⁺ T cells in the BM (left, n = 6-8) of WT, +/1013 and 1013/1013 mice. Contribution of CD45.2 (+/1013 or 1013/1013, mean, n = 5-13) in BM CD4⁺ T cells of mixed BM chimeras in WT (CD45.1) recipients. The dotted horizontal line indicates the expected 50% chimerism between CD45.1⁺ and CD45.2⁺ donor cells. Each circle indicates an individual mouse. Results are from 3 to 5 independent experiments. **P* < .05,

** $P < .005$ and *** $P < .0005$ compared with WT cells, CD45.1⁺ WT donor cells or labeled WT cells; § $P < .05$ and §§ $P < .005$ compared with +/1013 cells.

Figure 5: Heterozygous and homozygous *Cxcr4*¹⁰¹³ mutations differentially impact on peripheral lymphocyte compartmentalization. (A) Absolute numbers (mean ± SD, n = 5-7) of total spleen (left) or i/axillary (a)LN (right) B cells (gated B220⁺CD3⁻) and T cells (gated B220⁻CD3⁺CD4⁺ or CD8⁺) are shown. (B) Contribution of CD45.2 (+/1013 or 1013/1013, mean, n = 5-12) in spleen and iLN CD4⁺ or CD8⁺ T cells and B220⁺ B cells of mixed BM chimeras in WT (CD45.1) recipients. The dotted horizontal line indicates the expected 50% chimerism between CD45.1⁺ and CD45.2⁺ donor cells. Each circle indicates an individual mouse. (C) Spleen and iLN sections from WT (CD45.1) recipients reconstituted with mixed BM chimeras were immunostained for CD45.1 and B220 or CD3. The color code of mAbs used is shown. Objectives, 2×/10× (spleen) and 10×/30× (iLNs); scale bars denote 500 μm. (D) Absolute numbers (mean ± SD, n = 6) of sinusoidal (CD45⁺) B220⁺ B cells and CD4⁺ or CD8⁺ T cells in LNs of WT, +/1013 and 1013/1013 mice. (E) The percentage (mean ± SD, n = 3-5) of BrdU⁺ (upper) or cleaved caspase-3 apoptotic (lower) B cells and CD4⁺ or CD8⁺ T cells were analyzed in the spleen and iLNs from WT, +/1013 and 1013/1013 mice. Results are from 3 to 5 independent experiments (A, B, D and E) or are representative out of 3 independent determinations (C). * $P < .05$, ** $P < .005$ and *** $P < .0005$ compared with WT or CD45.1⁺ WT donor cells; § $P < .05$ compared with +/1013 cells.

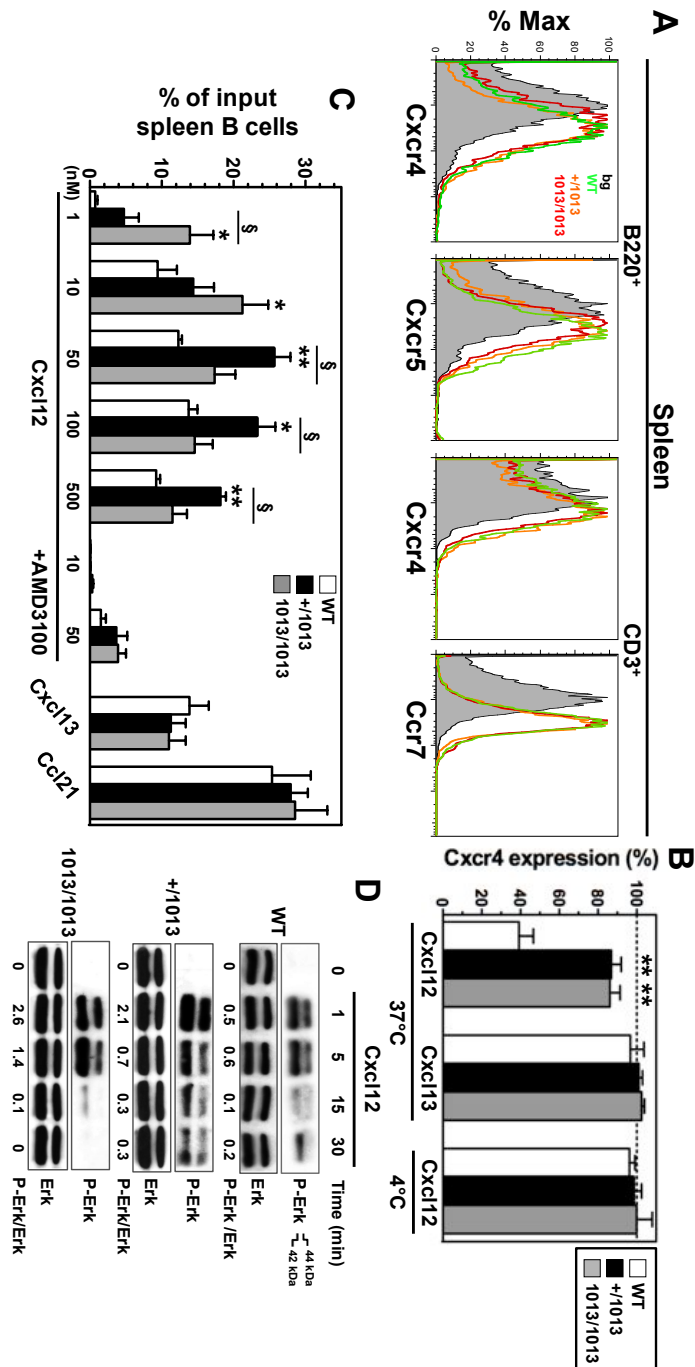
Figure 6: Increased numbers of plasma cells in draining $Cxcr4^{+/1013}$ LNs after TD immunization. (A) Sera of WT and +/1013 mice were collected before immunization (U/C, unchallenged) or after primary (D14, d 14 after challenge) and boost (d 5 after boost) immunization with SAS-adjuvanted HEL or OVA and analyzed by ELISA for OVA-specific IgG titers (mean \pm SD, n = 5-6). (B) Periaortic LN (pLN) sections were immunostained for CD4, PNA and IgD. The color code of mAbs or lectin used is shown to the right. Objective, 10 \times ; scale bars denote 500 μ m. (C) Absolute numbers (mean \pm SD, n = 5-6) of gated B (CD19⁺CD3⁻) cells were determined from pLNs and analyzed for the content in OVA-specific GC (B220⁺CD138⁻Fas⁺GL7⁺IgD⁻OVA⁺) B-cell and PC (B220⁻CD138⁺IgD⁻OVA⁺) subsets after OVA/SAS priming and boost. The flow-cytometric gating strategy for aforementioned lymphocyte subsets is depicted in Suppl. Fig. 2C. (D) ELISPOT assay of OVA-specific (IgG) ASCs in pLNs after challenge or boost immunization with SAS-adjuvanted HEL or OVA. Lines indicate the mean and one circle represents the mean value of ELISPOT triplicates of one mouse. (E) Absolute numbers (mean \pm SD, n = 5-6) of gated T (B220⁻CD3⁺) CD4⁺ cells were determined from pLNs and analyzed for the content in OVA-specific Tfh (CD44⁺CD62L⁻Cxcr5⁺OVA-I-Ab pMHCII tetramer⁺) cells after OVA/SAS priming and boost. The flow-cytometric gating strategy for T-lymphocyte subsets is depicted in Suppl. Fig. 2D. Results are from 3 independent experiments (A, C-E) or are representative out of 3 independent determinations (B). * $P < .05$ and ** $P < .005$ compared with WT cells.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

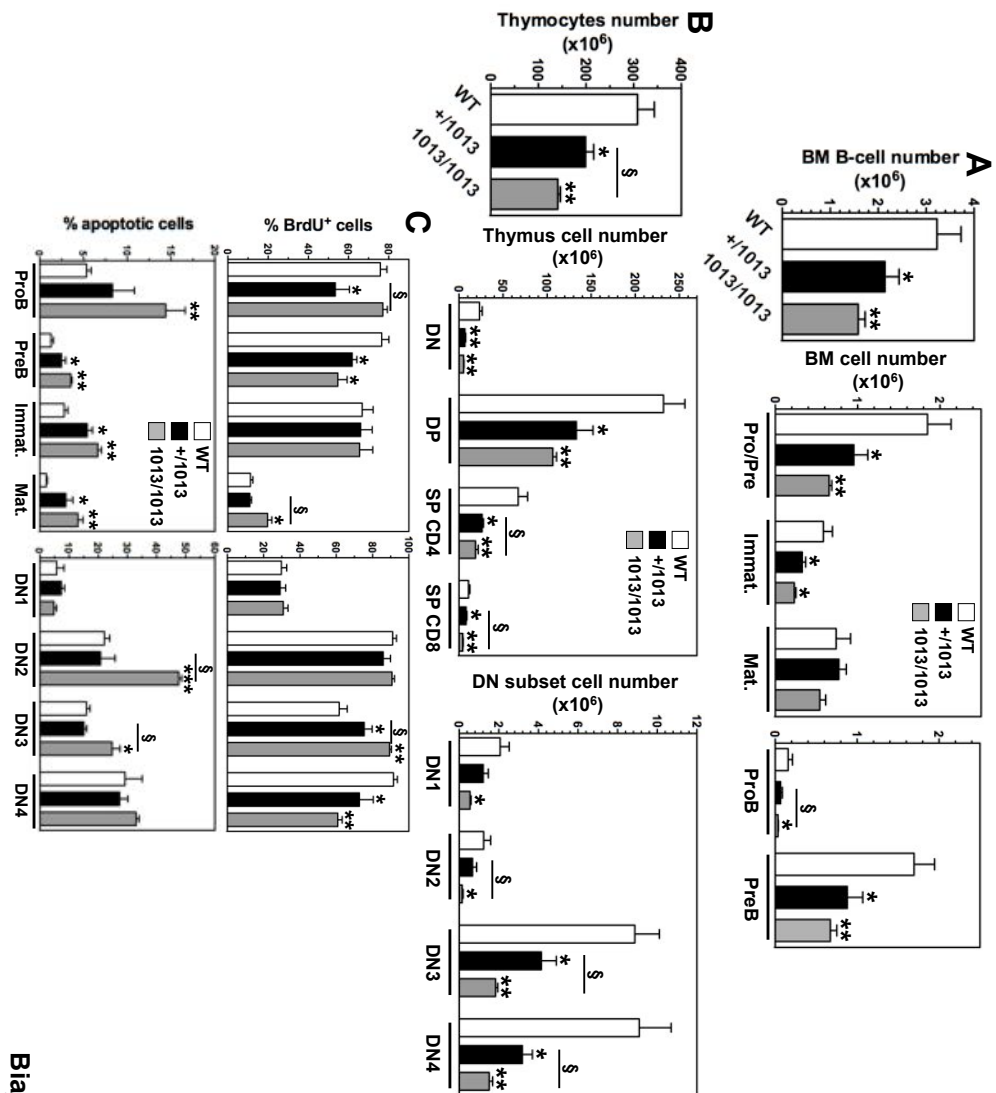
Supplemental Figure 1: Lymph node architecture in mice carrying the homozygous *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation. Inguinal LN sections from WT, *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ (+/1013) and *Cxcr4*^{1013/1013} (1013/1013) mice were immunostained (brown) for B cells with the B220 Ab, T cells with the CD3 Ab, peripheral LN addressin (PNAd) with the MECA-79 Ab and lymphatic vessels with the LYVE-1 Ab. Cortex (c), paracortex (pc) and medullary (m) areas are indicated. Original magnification: 10×, scale bars denote 250 μm. Results are representative of 3 independent determinations (n = 3).}

Supplemental Figure 2: Humoral immunity in mice carrying the *Cxcr4*¹⁰¹³ mutation.

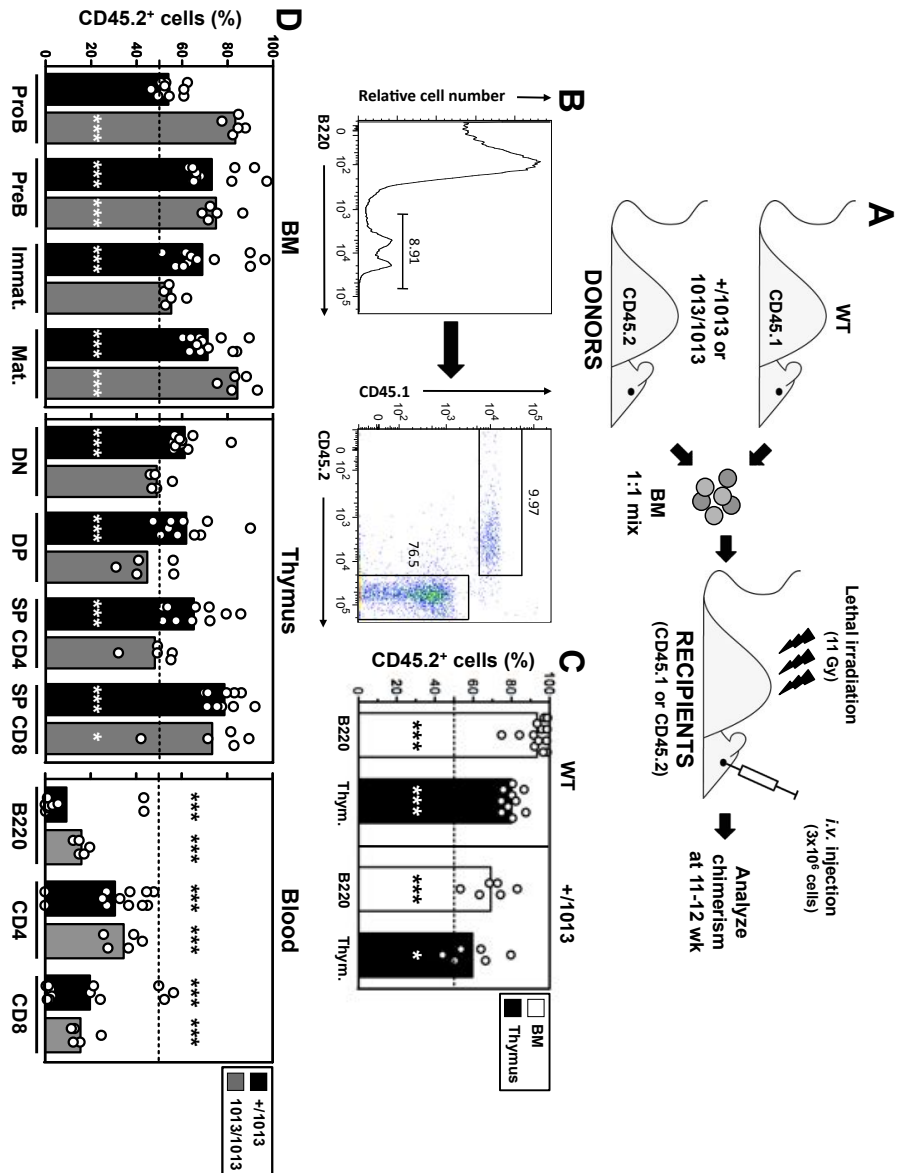
(A) Sera total immunoglobulins were analyzed. Results of all analyzed littermates are shown (n = 4). (B) Combinatorial diversity calculated by the frequency of transcripts of a given in-frame V(D)J rearrangement in spleen lymphocytes (n = 5). (A and B) Lines indicate the mean and each circle indicates an individual mouse. (C and D) Dot-plots show the flow-cytometric gating strategies used for (C) OVA-specific (OVA⁺IgD⁻) GC B cells (defined as CD19⁺CD3⁻CD138⁻B220⁺Fas⁺GL7⁺) and plasma cells (defined as CD19⁺CD3⁻CD138⁺B220⁻) and for (D) OVA-specific Tfh cells (defined as B220⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD44⁺OVA-I-Ab pMHCII tetramer⁺CD62L⁻Cxcr5⁺) in pLNs from *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ mice 5 d after OVA/SAS boost. Numbers show the frequency of each cell subset in the indicated gates. One dot-plot represents one mouse. **P* < .05 and ***P* < .005 compared with WT cells; §*P* < .05 compared with +/1013 cells.}



Biajoux et al.
Figure 1

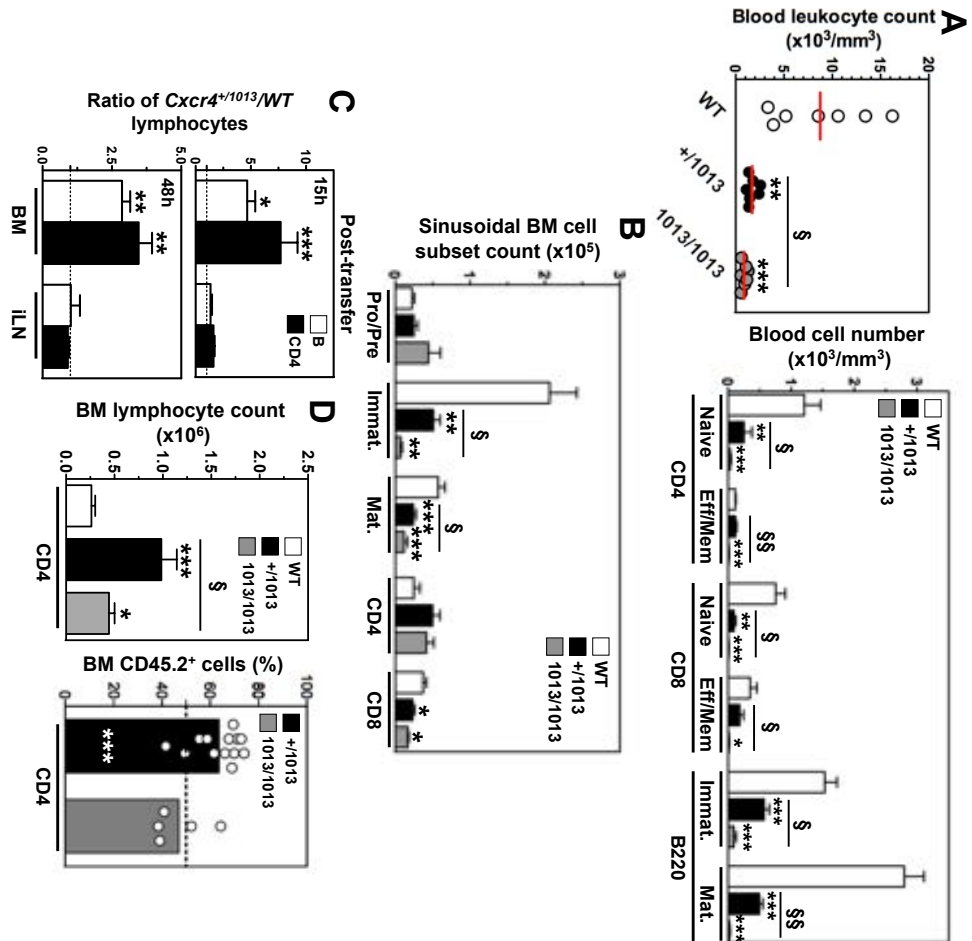


Biajoux et al.
Figure 2

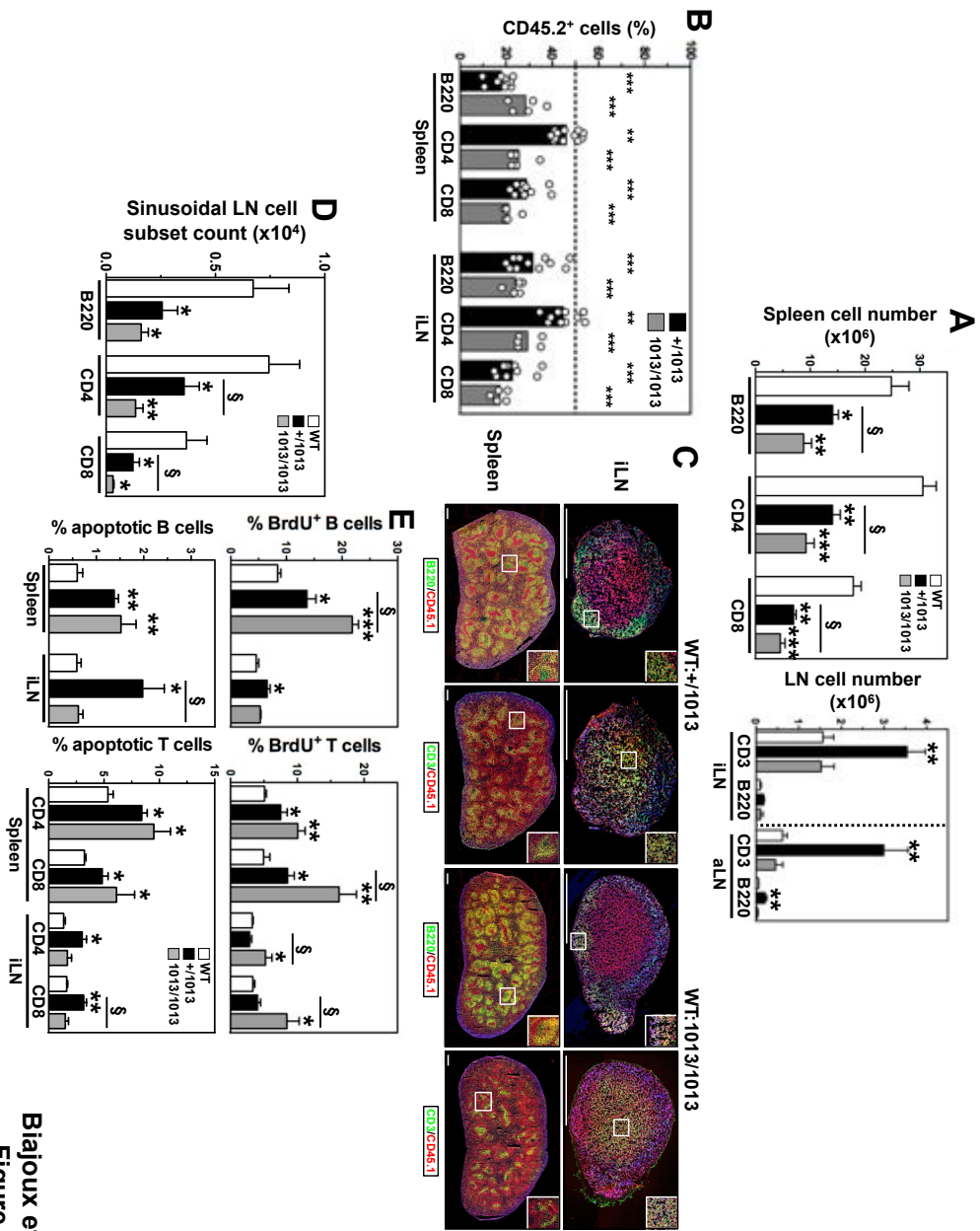


Biajoux et al.
Figure 3

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

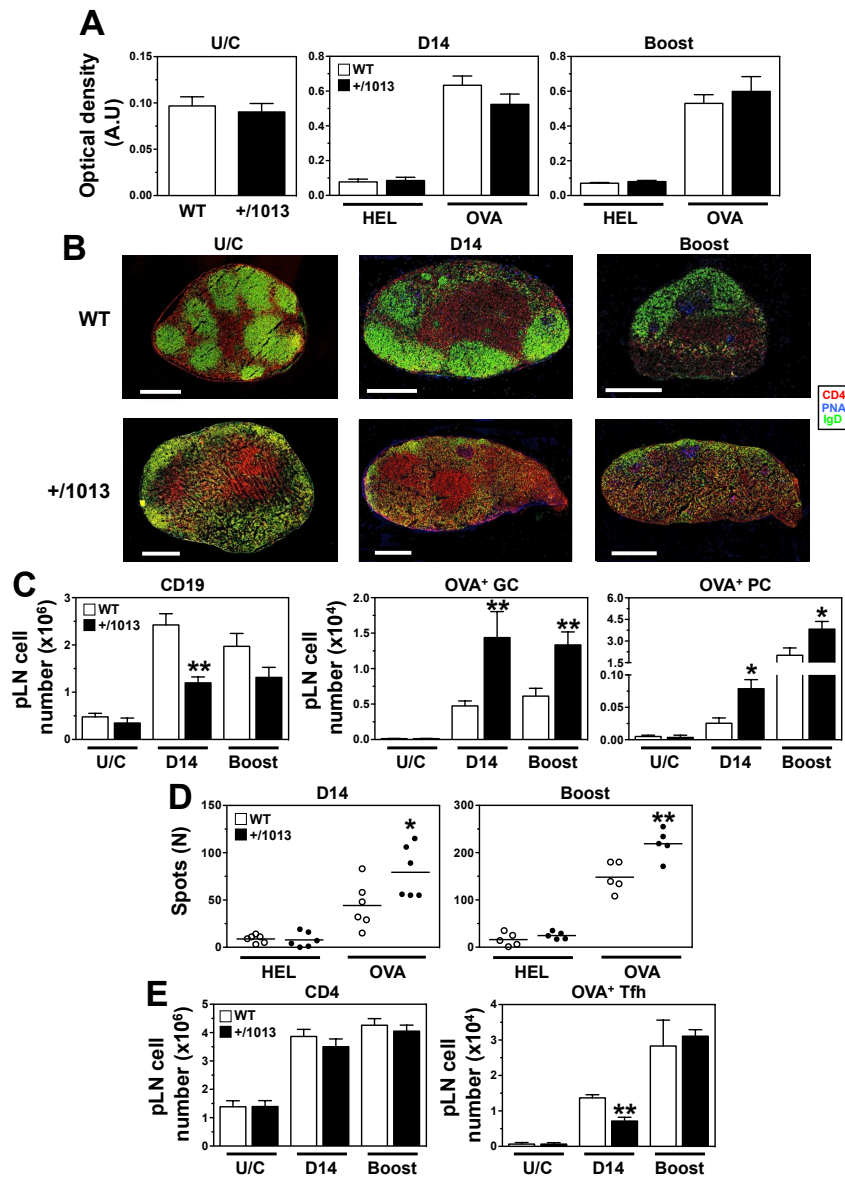


Biajoux et al.
Figure 4



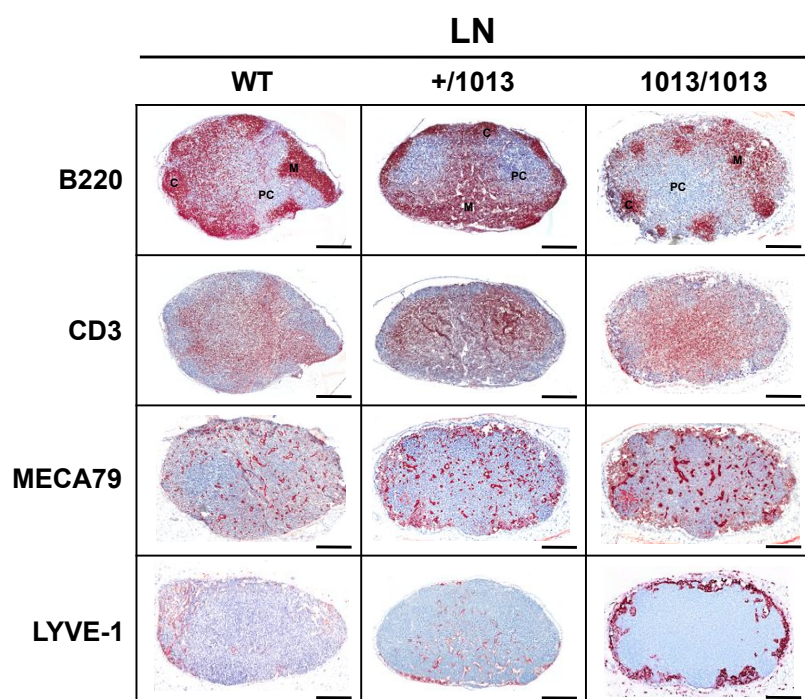
Biajoux et al.
Figure 5

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*



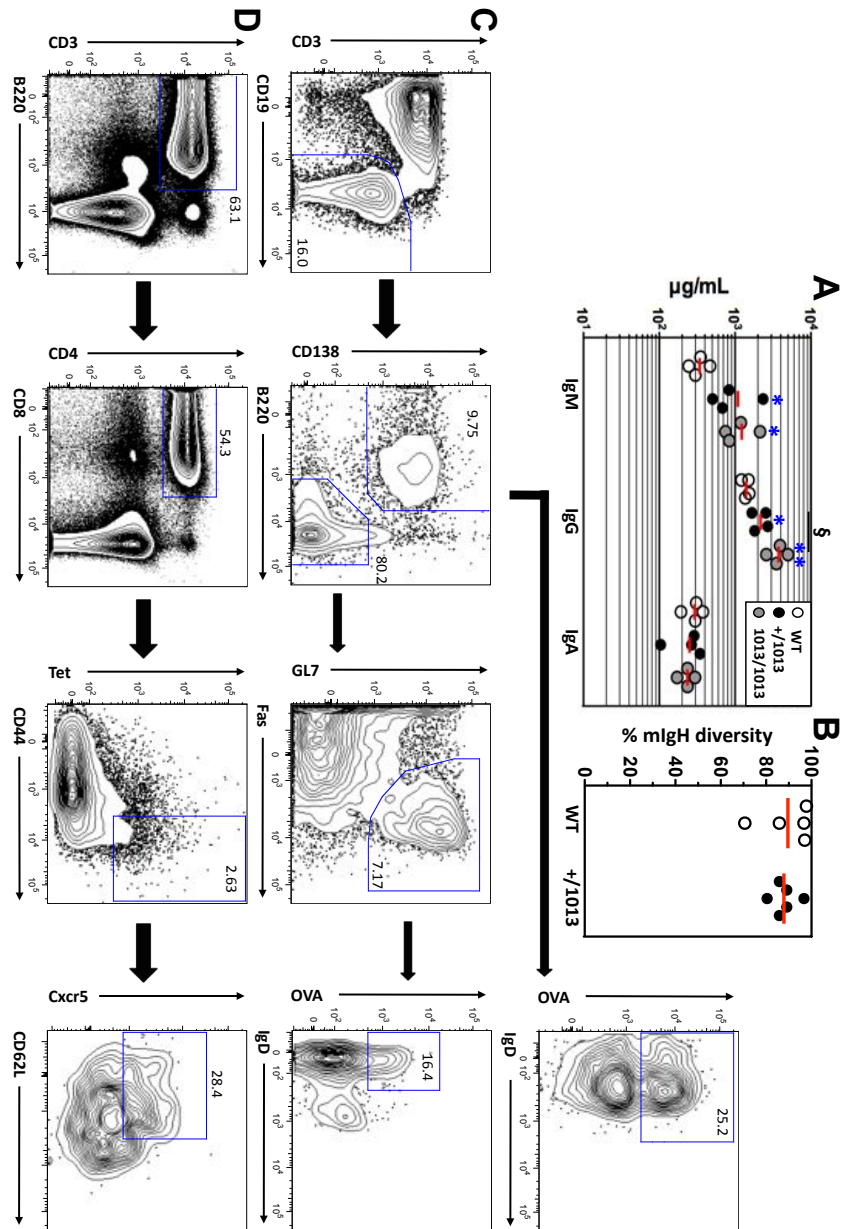
Biajoux et al.
Figure 6

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*



Biajoux et al.
Suppl. Figure 1

Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes



Biajoux et al.
Suppl. Figure 2

3- Conclusion et perspectives

Dans cette étude, que je signe en première position, nous avons produit un modèle murin homozygote pour la mutation $Cxcr4^{1013}$, dans lequel nous avons caractérisé des altérations précoces de la lymphopoïèse B et T, et l'avons comparé au modèle hétérozygote précédemment décrit. Nous avons remarqué de façon inattendue que si la co-expression des deux récepteurs $Cxcr4^{1013}$ et sauvage générait une phosphorylation de ERK maintenue dans le temps, l'expression de deux allèles $Cxcr4^{1013}$ était associée à un signal ERK transitoire. Or, l'abolition du domaine C-terminal de ce récepteur à l'état homozygote est censée prévenir une désensibilisation homologue de la signalisation dépendante des protéines G. En revanche, il n'est pas exclu que la temporisation du signal soit due à un processus de désensibilisation hétérologue (Luttrell & Gesty-Palmer, 2010).

Nous supposons donc que la signalisation par les β -Arr est responsable du maintien du signal chez la souris hétérozygote et qu'elle nécessite une interaction avec un domaine C-terminal intègre pour favoriser le recrutement sur un motif SHSK dans la 3^e BIC de ces médiateurs de la signalisation ; ce processus est compatible avec le concept de formation d'hétérodimères $Cxcr4^+/Cxcr4^{1013}$ à la membrane (Lagane *et al.*, 2008). Ce concept de dimère est supporté, de plus, par l'effet trans-dominant de $Cxcr4^{1013}$ qui est capable de prévenir l'internalisation induite par Cxcl12 de façon équivalente dans les souches hétérozygotes et homozygotes.

Nous avons aussi observé que les altérations de la lymphopoïèse sont plus précoces chez la souris homozygote que la souris hétérozygote et suivent un modèle allèle-dose-dépendant.

Par exemple, la diminution des thymocytes DN1 pourrait refléter un défaut de migration des ETP depuis la MO vers le thymus ou une production diminuée de ces cellules dans la MO. De même, la diminution des ProB sur ces même souris ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'un défaut des ProB ou d'un problème de différenciation en amont. Afin d'apporter un éclaircissement sur ces phénotypes, il serait crucial d'étudier la biologie des CSH dans ce modèle.

De plus, le rôle acquis de CXCR4 et CXCL12 dans le développement des CSH suggère que les altérations du processus de désensibilisation et d'internalisation du récepteur pourraient perturber fortement la capacité de ces cellules à se différencier correctement, notamment en les dirigeant vers des niches inappropriées, comme le suggère la tendance à la fraction ProB/PreB à se trouver surreprésentée près des compartiments vasculaires.

Les processus de prolifération et d'apoptose ne rendent pas compte de ce modèle allèle-dose-dépendant et les deux modèles présentent des altérations spécifiques, notamment dans les OLP et les GL.

Par exemple, l'augmentation de l'apoptose dans le thymus ne touche que les souris homozygotes, et spécifiquement les populations DN2 et DN3, ce qui souligne le rôle central du domaine C-terminal dans la survie de ces cellules. De façon analogue, les LT des GL de la souris hétérozygote souffrent d'une apoptose exacerbée, et ceux de la souris homozygote d'une prolifération accrue. Ce résultat indique que la signalisation prolongée de Cxcr4 mène à une apoptose exacerbée, mais que l'induction rapide de celle-ci favorise la prolifération. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier d'autres voies de transduction impliquées dans la survie, telles que PI3K/Akt.

Il est probable que la normalisation de la structure et de la cellularité des GL de la souris homozygote pour la mutation soit une démonstration du processus précité. Si l'on considère que les cellules stromales ganglionnaires réagissent, non pas à l'intensité de la signalisation induite par Cxcl12, mais à sa modulation, alors les souris sauvages et homozygotes présentant des signalisations temporaires vont adopter un phénotype architectural de type sauvage. En revanche, le maintien de la signalisation chez la souris hétérozygote va alors déstructurer l'architecture stromale, notamment en altérant les vaisseaux lymphatiques LYVE-1⁺, et favoriser une rétention ou un positionnement anarchique.

De fait, nous avons utilisé un système d'immunisation artificiel pour déterminer si les souris porteuses de la mutation à l'état hétérozygote étaient capables de produire une réponse humorale spécifique de l'Ag. Nous avons observé dans ce contexte que les souris modèles de lymphopénie liée au défaut de désensibilisation de Cxcr4 sont capables de

produire une réponse immunitaire humorale spécifique, que la production de LB du CG et de PC spécifiques était plus importante à la fois après immunisation mais aussi après un rappel antigénique. Ce résultat ne permet pas d'exclure la possibilité que le gain de fonction de Cxcr4 puisse promouvoir la différenciation des LB en PC à courte durée de vie, possiblement *via* un effet « spectateur » (*bystander*) ou *via* des réactions extra-folliculaires. Dès lors, il serait intéressant d'effectuer des rappels antigéniques à des temps plus longs et d'étudier, par des expériences de transfert passif de PC triés dans des souris ayant subi une déplétion des LB, la durée de vie effective des PC produits.

Cxcr4 étant exprimé à la fois sur les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, nous avons démontré par des expériences de reconstitution de l'hématopoïèse par compétition que les cellules médullaires greffées porteuses de la mutation présentaient une capacité accrue à greffer les receveurs sauvages et mutants mais que leur contribution était sous-représentée en périphérie. Cette observation corrobore une étude faite avec des cellules de témoins CD34⁺ transfectées pour un récepteur CXCR4 tronqué en position 1000 (Kawai *et al.*, 2007). Ce résultat démontre formellement que les dérégulations de l'hématopoïèse des souris hétérozygotes et homozygotes pour la mutation Cxcr4¹⁰¹³ sont dues à un processus intrinsèque aux cellules et que la contribution des tissus non-hématopoïétiques est mineure. Il est néanmoins intéressant d'observer que, malgré des diminutions des LB et LT dans les OLP des souris porteuses de la mutation non manipulées, la prévalence des cellules dérivées de celles-ci pose une question quant au mode d'action de Cxcr4¹⁰¹³ conférant un avantage sélectif à la greffe. Il est possible que le gain de fonction de Cxcr4 exacerbe le tropisme des cellules porteuses de la mutation vers des organes producteurs de Cxcl12 et notamment la MO.

Aussi, nous avons étudié, à l'aide de co-transferts adoptifs de splénocytes triés et fluoromarkés, le profil migratoire des LT CD4⁺ et LB. De façon univoque, les lymphocytes porteurs de la mutation à l'état hétérozygote montrent un tropisme exacerbé pour la MO, mais ne montrent pas d'accumulation dans les GL aux temps étudiés (15h et 48h après injection). Ceci indique que la mutation Cxcr4¹⁰¹³ biaise le profil migratoire en faveur de la MO, ce qui pourrait être une explication de l'avantage sélectif de la greffe des cellules porteuses de l'allèle muté. Un élément important peut être dégagé de ce test.

Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

En effet, l'absence de différences dans les GL indique que le gain de fonction n'influe pas sur l'entrée des LB et LT dans le ganglion et, de fait, n'est pas la cause de l'hypercellularité ganglionnaire.

D'autre part, l'utilisation d'Ac anti-CD45 fluoromarcué a permis de mettre en évidence un défaut de sortie des LB et LT de la MO et des GL. De cette façon, nous démontrons formellement le rôle de l'hyperactivation de Cxcr4 dans la rétention des lymphocytes dans la MO, mais contrairement aux NK (Mayol *et al.*, 2011) avons mis en évidence cet effet dans les GL, ce qui n'avait jusqu'alors jamais été montré.

Ces deux méthodes nous permettent donc de démontrer que l'hyperactivation de Cxcr4 génère une perturbation de la domiciliation périphérique en diminuant la sortie des LB de la MO, mais aussi en retenant les LB et LT dans les GLs et en favorisant un tropisme médullaire des LB et LT porteurs de la mutation Cxcr4¹⁰¹³.

La conclusion générale de ce travail est la démonstration que le gain de fonction généré par le récepteur Cxcr4¹⁰¹³ dans la souris engendre des altérations du comportement lymphocytaire. L'hyperactivité de Cxcr4 en réponse à Cxcl12 cause une diminution de la lymphopoïèse B et T, qui est un mécanisme de la lymphopénie due au gain de fonction de Cxcr4. La domiciliation périphérique anormale des LB et LT contribue aussi à la lymphopénie et s'exerce *via* deux mécanismes principaux. Premièrement, la sensibilité accrue au pouvoir chimiotactique de Cxcl12 diminue la capacité de sortie des LB immatures de la MO et génère un tropisme préférentiel des LB matures recirculants et LT vers cet organe. Deuxièmement, la rétention anormale des LB et LT dans les GL contribue de façon analogue à leur sous-représentation dans le sang.

Le développement de thérapeutiques efficaces pour corriger la lymphopénie due au gain de fonction de Cxcr4 nécessite donc d'envisager ces deux phénomènes. Il est nécessaire de produire des agents capables de promouvoir une différenciation optimale des progéniteurs et précurseurs lymphocytaires, vraisemblablement en optimisant leur positionnement dans les OLP. Il est en outre nécessaire de prévenir la rétention périphérique des lymphocytes ou de déterminer des méthodes pour favoriser la sortie de

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

ces cellules depuis les GL. Pour cela, des agonistes des S1PR pourraient être des candidats de choix.

Discussion et Perspectives

*« Car jamais un acte n'est décisif par lui-même; ce qui compte, c'est la connaissance de
cet acte, et ses conséquences. »*

Stefan Zweig

(Amerigo, 1941)

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Durant cette thèse, j'ai contribué à la mise en évidence de dérégulations de la lymphopoïèse et de la compartimentalisation périphérique dans un modèle murin portant la mutation « gain de fonction » $Cxcr4^{1013}$ à l'état hétérozygote ou homozygote. Ces modèles expérimentaux ont permis de démontrer le rôle clef de la désensibilisation médiée par le domaine C-Terminal de Cxcr4 dans la biologie lymphocytaire. Cxcr4 influence de façon différente le comportement cellulaire des lignages leucocytaires. En effet, les LB et LT présentent des problèmes de leucopoïèse, à l'inverse des NK et granulocytes. Ce gain de fonction génère consensuellement une altération de la domiciliation périphérique des lymphocytes, soit par la rétention (NK) médullaire, soit par un profil migratoire altéré (LB, LT). Ces altérations sont dues à un phénomène intrinsèque aux cellules porteuses de la mutation (LB, LT). Nous avons observé que les altérations du SI dues au gain de fonction de Cxcr4 ne sont pas des obstacles à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative à médiation humorale, même si l'efficacité de cette réponse reste à démontrer dans des modèles d'infection.

1- Une empreinte de récepteurs identique

Lorsque l'on considère les trois souches de souris ($Cxcr4^{+/+}$, $Cxcr4^{+/1013}$ et $Cxcr4^{1013/1013}$), nous observons que sur les NK ($Cxcr4^{+/+}$ et $Cxcr4^{+/1013}$), LB et LT ($Cxcr4^{+/+}$, $Cxcr4^{+/1013}$ et $Cxcr4^{1013/1013}$), l'expression membranaire de Cxcr4 et des autres RCK étudiés est identique. Le processus de resensibilisation (mobilisation du compartiment de récepteurs intracellulaires) et le lavage acide (découplage du ligand fixé au récepteur pour écarter la possibilité du masquage de l'épitope reconnu par l'Ac) pourraient en revanche apporter un biais dans cette observation. En effet, il n'est pas exclu qu'il existe chez les souris hétérozygotes un compartiment intracellulaire de $Cxcr4^+$ et que le récepteur $Cxcr4^{1013}$ soit présent quasi-exclusivement à la membrane. Bien que non détaillé ici, une expression membranaire identique entre les trois souches a été contrôlée et vérifiée sur des thymocytes, LB et LT spléniques marqués *ex vivo*, sans prétraitement, après resensibilisation seule et après lavage acide seul. Cela exclut tout biais expérimental quant à la quantification de l'expression membranaire de Cxcr4 sur les trois souches. La

question qui se pose alors légitimement est la suivante : comment expliquer cette expression normale à la surface de cellules, dont le récepteur est réfractaire à l'internalisation induite par la fixation du ligand, alors qu'il est attendu une accumulation membranaire ?

Une hypothèse vient de la capacité de Cxcr4 à hétéro-oligomériser avec d'autres RCKs membranaires (Cxcr2, Cxcr7, Ccr2, Ccr5) (Bernhagen *et al.*, 2007; Levoye *et al.*, 2009; Wang & Norcross, 2008). En effet, il n'est pas exclu que l'hétéromère formé soit capable de fixer à la fois Cxcl12 et un autre CK ligand, faisant internaliser le complexe indépendamment de Cxcl12. Dans ce contexte, le partenaire le plus probable de Cxcr4 serait Cxcr7. En effet, celui-ci a la capacité de dimériser avec Cxcr4, de fixer Cxcl11 et de constitutivement effectuer des cycles entre la membrane et le compartiment cytosolique. Un autre argument pouvant expliquer ce processus est l'absence de la production de Cxcl11 par les souris C57Bl/6, fond génétique du *knock-in*. Aussi, Cxcr4 et Cxcr7 ne possèdent que Cxcl12 comme seul et unique ligand de nature chimiokinique. Bien que nécessitant une démonstration formelle, un nouveau paradigme à exploiter serait que la régulation de la signalisation par les CK impliquerait la disponibilité membranaire du RCK.

Dans un premier temps, il serait nécessaire d'étudier la production et la stabilité de l'ARNm de *Cxcr4*¹⁰¹³, notamment s'il existe des processus de rétrocontrôles transcriptionnels suite à la fixation de Cxcl12 sur son récepteur ou d'ARN-interférence agissant sur la forme tronquée. Dans un second temps, il faudrait visualiser la synthèse et la migration protéique de *Cxcr4*¹⁰¹³ de façon dynamique, *via* l'utilisation de récepteurs couplés à des protéines fluorescentes en réponse, ou non, à Cxcl12. Enfin, il conviendrait de déterminer les partenaires d'hétéro-oligomérisation par des techniques de *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET).

2- La trans-dominance, une prise d'otage membranaire ?

Précédemment, il a été montré que l'homologue humain CXCR4⁺ est capable de s'hétéro-dimériser *in vitro* avec son analogue mutant CXCR4¹⁰¹³ (Lagane *et al.*, 2008). Néanmoins, cette mise en évidence ne permet pas de l'affirmer *in vivo*. Nous apportons, de façon indirecte, des éléments supportant ce concept. Premièrement, les lymphocytes

porteurs de $Cxcr4^{1013}$ présentent un gain de fonction lors de tests de chimiotaxie en réponse à Cxcl12 en chambre de Transwell. Il est donc légitime de considérer que, lorsque la souris exprime uniquement $Cxcr4^{1013}$, la souris hétérozygote exprime les deux récepteurs à la surface et que ces derniers sont capables d'induire une réponse cellulaire, avec une stœchiométrie qui influencerait la signalisation. Deuxièmement, le défaut d'internalisation après fixation de Cxcl12 est comparable entre les souris hétérozygotes et homozygotes. Si dans le cas de la souris hétérozygote, ce défaut d'internalisation a été rapporté chez le patient, il est étonnant de voir que chez la souris homozygote, qui présente une capacité à rétrocontrôler la phosphorylation de ERK contrairement à la souris hétérozygote, le défaut d'internalisation est préservé. Il est donc possible d'imaginer que le $Cxcr4^{1013}$ dimérise préférentiellement avec $Cxcr4^+$ et le retienne à la membrane après fixation du ligand. $Cxcr4^{1013}$ à l'état homozygote est incapable de présenter une réponse ERK soutenue. Chez l'hétérozygote, il s'agirait de la forme $Cxcr4^+$ de l'hétérodimère qui, maintenu à la membrane, serait bloqué dans une conformation permettant la signalisation dépendante des β -Arr. L'étude de l'interaction physique et biochimique entre les deux récepteurs *in vivo* est désormais possible *via* le modèle murin hétérozygote et ouvre un nouveau champ de recherche sur la biochimie de Cxcr4.

3- Les altérations de la lymphopoïèse B, un problème de niche ?

Nous avons montré chez les souris hétérozygotes et homozygotes une diminution du nombre de LB médullaires. Nous avons aussi observé que des altérations touchent de façon plus précoce les LB dans la souche homozygote. Lors de l'étude des mécanismes cellulaires, nous avons observé une apoptose augmentée dans toutes les populations B médullaires à l'exception du stade ProB chez la souris hétérozygote. Cxcl12 a été initialement identifié comme un facteur de croissance des PreB. Une hyperactivation de l'axe de signalisation aurait pour effet de favoriser cette prolifération. Or, nous rapportons une diminution de la prolifération sur les stades ProB et PreB chez la souris hétérozygote, ce qui suggère deux choses : Une signalisation inappropriée de $Cxcr4^{1013}$ lors d'un « *checkpoint* » de développement rendrait compte d'une diminution du stade PreB. Il peut aussi s'agir d'un mauvais positionnement médullaire qui entraîne un développement dans une niche qui ne présente pas les facteurs de différenciation

nécessaires. Il est connu que la formation des niches hématopoïétiques nécessite la présence de Cxcl12 et que ce même ligand est impliqué dans le recrutement des CSH circulantes dans le processus de greffe. Les cellules stromales périvasculaires, endothéliales et ostéoblastes produisent Cxcl12 (Ding *et al.*, 2012). Pour se loger dans la niche correspondant à leur niveau de maturation, les CSH et progéniteurs vont non seulement utiliser le gradient de Cxcl12, mais aussi faire appel à d'autres facteurs spécifiques pour assurer leur survie. Dans un contexte d'hyperactivation de Cxcr4, les CSH pourraient alors se localiser dans des niches anormales pour leur niveau de différenciation. L'augmentation non significative de la fraction ProB/PreB dans les souris homozygotes pour la mutation suggérerait un problème de positionnement des LB précoces près de la niche périvasculaire. Il a été montré que cette fraction réside normalement dans la niche endostéale (Ding & Morrison, 2013). Il est alors possible que les populations LB soumises à une apoptose exacerbée seraient en définitive des LB qui résideraient dans des niches inappropriées. Les LB ne recevant pas les facteurs de croissance et/ou survie nécessaires, ne prolifèreraient plus suffisamment et entreraient en apoptose.

Pour déterminer s'il existe une domiciliation inappropriée des cellules immatures, il est possible d'utiliser l'injection *in vivo* d'Ac anti-CD45 appliquée à des temps d'imprégnation d'organes plus longs. La diffusion parenchymateuse de l'Ac s'opérant en fonction du temps, cette technique permettrait de déterminer par cytométrie en flux les populations occupant la niche périvasculaire et de les comparer avec celles des souris sauvages. Une autre méthode consisterait en l'analyse par immunofluorescence de sections de MO pour les populations précoces de l'hématopoïèse, et notamment en la caractérisation du nombre de niches et des facteurs de croissance et de survie (SCF, IL-7, CXCL12) produits dans celles-ci.

4- Hyperactivité de Cxcr4 et prise de greffe

Les souris porteuses de l'allèle codant pour *Cxcr4*¹⁰¹³ présentent un avantage sélectif dans la reconstitution d'hématopoïèse par compétition. Les raisons pour lesquelles la greffe de ces cellules est plus efficace ne sont pas encore connues. Plusieurs explications pourraient rendre compte de ce fait :

Premièrement, le mélange de cellules médullaires se fait à l'aide de cellules nucléées de MO comptées sans discrimination morphologique. Il n'est pas exclu que les souris porteuses de *Cxcr4*¹⁰¹³ possèdent naturellement plus de CSH. Les altérations de la lymphopoïèse seraient alors dues à des « checkpoints » développementaux des progéniteurs (*i.e.* costimulation inefficace). Dans ce cas, à tropisme médullaire égal, la meilleure prise de greffe serait due à une augmentation de la population de CSH. Néanmoins, un groupe (Kawai *et al.*, 2007) a utilisé les CSH circulantes transduites pour le récepteur *CXCR4*¹⁰⁰⁰, rapporté dans le SW, afin d'évaluer ce processus. Les auteurs ont injecté un nombre égal de CSH circulantes transduites ou non pour le récepteur *CXCR4*¹⁰⁰⁰ et observé que les cellules porteuses du récepteur tronqué présentaient une meilleure capacité de greffe. Ceci suggère que le nombre de CSH n'est pas la raison de cette observation mais serait due à la signalisation induite par Cxcl12. Un phénotypage exhaustif de la MO de ces souris permettrait de le déterminer formellement.

Deuxièmement, les capacités clonogéniques, de prolifération et de survie des CSH et progéniteurs pourraient être favorisées chez les souris mutantes. Concernant ce point, nous avons observé que les cellules porteuses de la mutation à l'état homozygote présentaient une diminution de leur représentation médullaire au cours de la différenciation. L'explication serait que les CSH et progéniteurs porteurs du *Cxcr4*¹⁰¹³ auraient un avantage à la greffe dû à une expansion accrue de ces cellules dans leurs niches, diminuant la contribution des cellules sauvages par compétition. Des tests de clonogénicité sur des CSH triées permettraient de déterminer s'il existe effectivement une capacité de différenciation altérée chez ces souris (diminution de l'érythroïèse au profit de la leucopoïèse, par exemple). Des tests de greffes secondaires pourront ensuite étayer si l'allèle codant pour *Cxcr4*¹⁰¹³ est capable de maintenir une hématopoïèse plus efficace dans le temps. Enfin, l'utilisation de tests de prolifération et d'apoptose sur les souris chimériques apportera un éclaircissement sur le comportement des CSH greffées dans le receveur considéré.

Enfin, l'hypothèse la plus probable serait que les cellules injectées ont un tropisme exacerbé vers la MO. En effet, Cxcl12 est produit par la MO (Petit *et al.*, 2002), et est impliqué dans le recrutement des CSH mises en circulation (Lapid *et al.*, 2008). Nous

avons montré que les LT CD4⁺ et LB spléniques avaient une capacité accrue à entrer dans la MO après mise en recirculation. Aussi, le mécanisme principal serait que les CSH injectées rentreraient plus efficacement dans la MO de par l'hyperactivité de Cxcr4. Ainsi, l'avantage sélectif dû à la greffe aurait pour cause une colonisation plus efficace des niches *via* un recrutement exacerbé dans la MO, au détriment des CSH sauvages. Pour le déterminer formellement, l'utilisation de CSH triées et marquées par un colorant vital fluorescent permettra de suivre en fonction du temps le recrutement de ces cellules, et pourra être indicative du nombre de divisions au moment du prélèvement.

Un intérêt pourrait être tiré de ce processus. Si l'hyperactivité de Cxcr4 favorise la prise de greffe, il serait intéressant de trouver un partenaire intracellulaire à inhiber temporairement (tel que la GRK-3), qui serait impliqué dans le processus de désensibilisation (Balabanian *et al.*, 2005b), avant l'injection d'un greffon de patient. De même, une transfection non intégrative du *Cxcr4*¹⁰¹³ pourrait avoir l'effet recherché. Ainsi, les cellules prétraitées coloniseraient la MO plus efficacement. Ceci permettra de diminuer les quantités de CSH nécessaires à une transplantation efficace.

5- La transcytose dans le recrutement médullaire

Les LT CD4⁺ et LB spléniques porteurs de *Cxcr4*¹⁰¹³ présentent un profil migratoire biaisé pour la MO. Le mécanisme de ce processus est encore mal défini. Une étude récente a montré que les cellules endothéliales médullaires étaient capables de promouvoir la transcytose du ligand Cxcl12 vers la MO afin de permettre une rétention efficace des CSH dans la MO et de prévenir une « évasion » vers le sang (Dar *et al.*, 2006). *Cxcr4*¹⁰¹³ est incapable de s'internaliser après fixation de Cxcl12, ce qui suggère que le processus de transcytose, qui implique l'internalisation du récepteur par les cellules endothéliales, ne peut être mis en place. Il serait intéressant d'observer le comportement des cellules endothéliales médullaires vis-à-vis de ce processus, car on ne peut exclure que le défaut d'internalisation observé sur les lymphocytes soit identique sur un autre type cellulaire. Une des conséquences de l'abrogation du processus de transcytose serait une élévation de la concentration plasmatique de Cxcl12 et ne saurait rendre compte d'une contribution environnementale dans le biais de profil migratoire des lymphocytes porteurs de *Cxcr4*¹⁰¹³. Une hypothèse à étudier nécessiterait d'étendre

l'observation de la transcytose au-delà de l'internalisation unidirectionnelle de Cxcl12 du sang vers la MO. En effet, si on imagine que ce phénomène s'applique à la rétention du Cxcl12 produit par la MO qui diffuse passivement vers le sang, alors cette CK va tapisser les GAGs des cellules endothéliales, qui, n'effectuant pas de transcytose, sera présentée aux leucocytes circulants. Dès lors, ce mécanisme favoriserait le recrutement des leucocytes, et potentialiserait le gain de fonction dû à $Cxcr4^{1013}$. Si cette extension du processus de transcytose est effective, il faut toutefois souligner que celui-ci contribuerait de façon mineure au profil migratoire des cellules porteuses de l'allèle $Cxcr4^{1013}$. En revanche, l'utilisation d'agents capables d'inhiber la fixation de Cxcl12 aux GAGs pourrait prévenir cet effet.

6- A propos du thymus

Dans les souris non manipulées $Cxcr4^{+/1013}$ et $Cxcr4^{1013/1013}$, nous avons observé des altérations de l'ontogénie des LT dès le stade DN3 chez les souris hétérozygotes et DN1 chez les souris homozygotes. Ces dernières présentent une apoptose exacerbée aux stades DN2 et DN3, ce qui souligne un problème de sélection β , où $Cxcr4$ joue un rôle de costimulateur (Tramont *et al.*, 2010). La présence dans la zone subcapsulaire de Cxcl12 et la sensibilité accrue des leucocytes à son action chimioattractante pourrait altérer le positionnement des thymocytes DN dans un environnement approprié pour leur différenciation.

Dans le contexte des souris reconstituées par compétition de MO, les cellules dérivées de la souris $Cxcr4^{+/1013}$ sont les plus représentées pour tous les stades étudiés. Ceci suggère que les hypothèses postulées pour la MO sont aussi valables pour le thymus. En revanche, elles n'expliquent pas pourquoi, dans le cas de chimères $Cxcr4^{+/+}$ et $Cxcr4^{1013/1013}$, la représentation des thymocytes porteurs de la mutation est équivalente aux thymocytes sauvages (à l'exception des LT CD8⁺).

La méthode d'administration d'isolats médullaires peut apporter un biais. En effet, l'extraction des cellules de MO et leur ré-injection dans la circulation peuvent influencer sur les résultats. Les MO des souris $Cxcr4^{+/1013}$ pourraient posséder plus d'ETP que les souches sauvages et $Cxcr4^{1013/1013}$ qui seraient anormalement retenues dans la MO.

L'avantage à la greffe sera alors dû au plus grand nombre d'ETP remis en circulation. Si l'on considère que le nombre d'ETP est équivalent dans toutes les souches, il est probable que la souris *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ possède donc un avantage sélectif dû à un processus cellulaire (survie ou prolifération), alors que la souris *Cxcr4*^{1013/1013} présente un biais de différenciation pour le lignage CD8⁺ ou présente une rétention accrue des LT CD8⁺ spécifiquement.}

7- Cxcr4, Interleukine 7 et ganglions lymphatiques

Un des phénotypes majeurs chez la souris hétérozygote est la déstructuration ganglionnaire, qui n'est pas retrouvée chez la souris homozygote. Sur le plan biochimique, les lymphocytes issus de souris hétérozygotes sont les seuls à présenter le profil d'activation de ERK maintenu dans le temps. Les cellules *lymphoid tissue inducer* (LTi) sont des cellules CD4⁺ IL-7R α ⁺ qui agissent sur les cellules mésenchymateuses pour former un GL fonctionnel. L'IL-7 produite par les cellules LYVE-1⁺ est indispensable à la structuration du GL (Onder *et al.*, 2012). Il a été montré que l'IL-7 activait ces LTi (Chappaz & Finke, 2010) et que ces LTi exprimaient CXCR4 (Schmutz *et al.*, 2009). Si on suppose que, à l'instar des LT CD4⁺ (Schmitt *et al.*, 2003), l'IL-7 favorise l'expression de Cxcr4 sur les LTi et que la réponse ERK est maintenue, on peut imaginer que l'IL-7 produite par les cellules LYVE-1⁺ favorise l'expression de Cxcr4¹⁰¹³ sur les LTi. Ceci aura pour effet de modeler l'architecture du GL *via* les cellules mésenchymateuses. Les souris hétérozygotes, incapables de rétrocontrôler leur signalisation induite par Cxcl12, vont alors se retrouver dans un contexte où Cxcr4 est exprimé à la membrane signale continuellement. Ainsi, la structuration anormale des GL serait due à une activation séquentielle des LTI par les cellules LYVE-1⁺. L'hyperactivation de Cxcr4 entraîne alors une activation continue des LTi qui vont déstructurer l'organisation des cellules mésenchymateuses des GL. La présence de cellules LYVE-1⁺ anormalement positionnées dans le paracortex semble supporter cette hypothèse. Un moyen de comprendre ce processus serait de compter et de trier les LTi et de caractériser leur comportement en réponse à Cxcl12 par des méthodes de biochimie. Si les LTi contribuent à l'hypercellularité ganglionnaire et/ou présentent une activité

soutenue lors de la stimulation par Cxcl12, ils constitueraient une cible thérapeutique intéressante pour atténuer l'hyperplasie des GLs.

Cependant, un autre élément peut rendre compte de la diminution des cellules LYVE1⁺ dans le GL. En effet, mis à part leur positionnement anarchique, il a été fait état de la capacité des LT à diminuer la formation des vaisseaux lymphatiques (Kataru *et al.*, 2011). Aussi, il est possible que le défaut de sortie des LT du GL entraîne une accumulation qui va avoir pour effet de diminuer le nombre de vaisseaux LYVE1⁺ dans le GL. Bien que ces deux événements puissent être indépendants, ils pourraient agir de concert (l'un sur le positionnement des vaisseaux LYVE1⁺, l'autre sur le nombre).

8- *Cxcr4*¹⁰¹³, une piste pour l'autoimmunité ?

Dans des travaux récents, j'ai contribué à démontrer que, chez les patients souffrant de LED, les LB circulants présentaient une diminution de l'expression membranaire de CXCR4 et CXCR7, récepteurs pour la CK CXCL12 (Biajoux *et al.*, 2012). D'autres études montrent en revanche une augmentation de cette expression (Chong & Mohan, 2009; Wang *et al.*, 2010). Bien que non consensuelles, ces études montrent une altération de l'expression CXCR4 dans le LED, ce qui suggère une anomalie de sa signalisation. Dans le modèle de souris hétérozygote pour la mutation *Cxcr4*¹⁰¹³, nous avons observé que l'immunisation artificielle par un Ag permet une production accrue de LB du CG et PC spécifiques de l'Ag. La question centrale qui se pose alors est de savoir si cet effet observé est dû à un CG plus efficace ou si les PC produits résultent d'un effet « spectateur » (*bystander*). Il est possible que cette augmentation du nombre de PC soit due à un abaissement du seuil d'activation nécessaire pour que le LB se différencie en PC. Il serait intéressant de tester s'il est possible d'induire des réactions autoimmunes plus facilement dans la souris *Cxcr4*⁺¹⁰¹³. Une méthode serait l'immunisation au Soi par l'injection de thymocytes privés de sérum. Ces cellules apoptotiques/nécrotiques fourniront à la fois le signal de danger et les Ag du Soi. Si effectivement ces souris venaient à produire plus efficacement des symptômes auto-immuns, alors le rôle de la signalisation médiée par Cxcr4 dans l'altération de la sélection périphérique des maladies auto-immunes serait démontré. L'utilisation d'antagonistes spécifiques de CXCR4 ou de ses voies de signalisation dans une polythérapie pourrait alors avoir un effet bénéfique.

9- S1P/S1PRs et Cxcl12/Cxcr4, quel axe de signalisation pour le traitement du Syndrome WHIM ?

L'utilisation aigue d'AMD3100, un antagoniste spécifique de CXCR4, chez les patients, a montré une efficacité à la normalisation de la formule leucocytaire (Dale *et al.*, 2011; McDermott *et al.*, 2011). Le rôle central de Cxcr4 dans la biologie du cœur (Penn *et al.*, 2012), du SNC (Mithal *et al.*, 2012) et des CSH (Suarez-Alvarez *et al.*, 2012) pourrait être prédictif d'un effet secondaire redouté lors de l'administration de cet antagoniste de façon chronique. De plus, des effets indésirables graves pourraient être à craindre lors de l'administration à des parturientes si l'antagoniste venait à passer la barrière placentaire. En effet, le phénotype embryonnaire léthal des souris invalidées pour *Cxcr4* indique un rôle non substituable de sa signalisation au cours du développement précoce.

Le ciblage du ligand Cxcl12 pourrait être une opportunité. Les mêmes problèmes que ceux liés à l'utilisation d'antagoniste de CXCR4 sont prévisibles, car les souris invalidées pour *Cxcl12* présentent le même phénotype que celles pour *Cxcr4*. Néanmoins, le ciblage du ligand permet une meilleure flexibilité des approches. En effet, plutôt que de cibler le ligand, il peut être intéressant de cibler sa fixation aux GAGs et ainsi sa disponibilité. Cette approche permet de conserver l'effet cellulaire paracrine de Cxcl12 lorsqu'il fixe Cxcr4 (prolifération, apoptose, costimulation), mais aussi de limiter la formation des gradients responsables de l'action chimiotactique (Entrée/Sortie des OLP/OLS).

Une approche alternative pourrait être l'utilisation d'agonistes au S1PRs. Le S1P est un médiateur de la sortie des cellules matures des OLP et OLS (Allende *et al.*, 2004; Allende *et al.*, 2010; Cyster, 2005; Jenne *et al.*, 2009; Zhi *et al.*, 2011). Cet agent, ou un agoniste des S1PRs, pourrait favoriser la libération des LB immatures et LT naïfs de leurs OLP spécifiquement. Un effet secondaire est néanmoins à craindre, car les CSH montrent aussi une dépendance vis-à-vis de ce ligand (Bendall & Basnett, 2013). L'étude toxicologique sera un point crucial, pour évaluer la diffusion parenchymateuse de l'agoniste, avant d'envisager son utilisation. Le principal avantage de cette cible est l'absence de phénotypes létaux ou problèmes développementaux pour les souris invalidées pour les récepteurs au S1P (Bendall & Basnett, 2013). Cela suggère que l'altération de cet axe de signalisation n'aurait pas les mêmes effets secondaires escomptés que pour Cxcr4.

En conclusion, il existe différentes approches de ciblage de Cxcr4 dans le traitement du SW, lié à son hyperactivité (**Figure 20**). Il demeure néanmoins indispensable de déterminer l'approche la plus satisfaisante quant à l'utilisation chronique du candidat. La caractérisation des mécanismes de la lymphopénie B, T et NK et des dysfonctions de l'immunité adaptative du modèle d'hyperactivation de Cxcr4 est la première étape de cette démarche. L'utilisation de ce modèle comme outil de criblage de l'effet des différentes drogues permettra de déterminer précisément leurs modes d'action et leurs effets au long terme dans le traitement du SW.

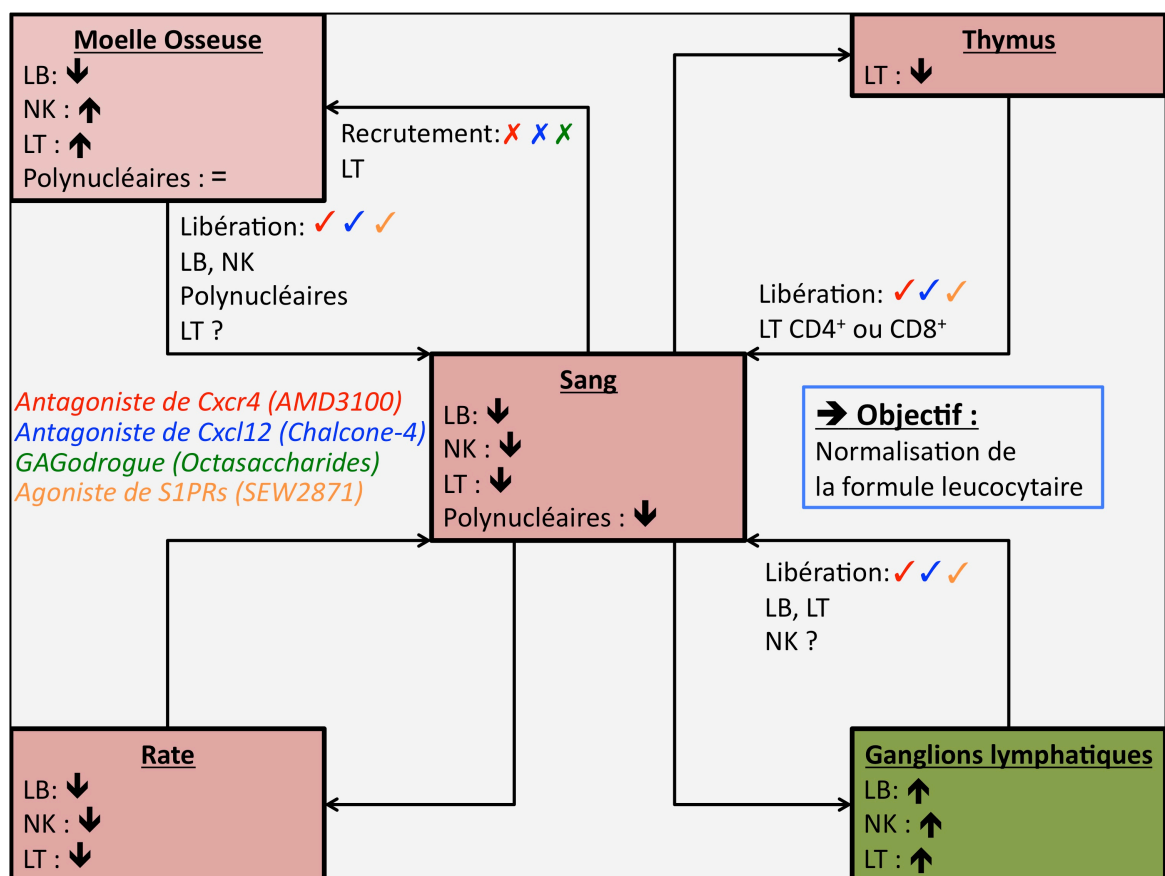


Figure 20 : Bilan des approches thérapeutiques pour atténuer l'hyperactivité de CXCR4 dans le Syndrome WHIM. Les compartiments lymphocytaires présentant une hypercellularité (en vert) ou une hypocellularité (en rouge) sont indiqués.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiuti, A., Tavian, M., Cipponi, A., Ficara, F., Zappone, E., Hoxie, J., Peault, B., Bordignon, C., Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lymphohematopoietic progenitors. *Eur J Immunol*, 1999, 29, 1823-1831.
- Alizon, S., Magnus, C., Modelling the course of an HIV infection: insights from ecology and evolution. *Viruses*, 2012, 4, 1984-2013.
- Allegretti, M., Cesta, M.C., Garin, A., Proudfoot, A.E., Current status of chemokine receptor inhibitors in development. *Immunol Lett*, 2012, 145, 68-78.
- Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., Cyster, J.G., Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*, 2004, 5, 943-952.
- Allende, M.L., Dreier, J.L., Mandala, S., Proia, R.L., Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem*, 2004, 279, 15396-15401.
- Allende, M.L., Tuymetova, G., Lee, B.G., Bonifacino, E., Wu, Y.P., Proia, R.L., S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med*, 2010, 207, 1113-1124.
- Anton, P.A., Elliott, J., Poles, M.A., McGowan, I.M., Matud, J., Hultin, L.E., Grovit-Ferbas, K., Mackay, C.R., Chen, I.S.Y., Giorgi, J.V., Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *AIDS*, 2000, 14, 1761-1765.
- Argiropoulos, B., Humphries, R.K., Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*, 2007, 26, 6766-6776.
- Arnon, T.I., Horton, R.M., Grigorova, I.L., Cyster, J.G., Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature*, 2013, 493, 684-688.
- Avery, D.T., Deenick, E.K., Ma, C.S., Suryani, S., Simpson, N., Chew, G.Y., Chan, T.D., Palendira, U., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Choo, S., Bleasel, K.E., Peake, J., King, C., French, M.A., Engelhard, D., Al-Hajjar, S., Al-Muhsen, S., Magdorf, K., Roesler, J., Arkwright, P.D., Hissaria, P., Riminton, D.S., Wong, M., Brink, R., Fulcher, D.A., Casanova, J.L., Cook, M.C., Tangye, S.G., B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J Exp Med*, 2010, 207, 155-171.
- Ayehunie, S., Garcia-Zepeda, E.A., Hoxie, J.A., Horuk, R., Kupper, T.S., Luster, A.D., Ruprecht, R.M., Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood*, 1997, 90, 1379-1386.
- Badolato, R., Defects of leukocyte migration in primary immunodeficiencies. *Eur J Immunol*, 2013. doi: 10.1002/eji.201243155.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B., Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15, 675-705.
- Balabanian, K., Brotin, E., Biajoux, V., Bouchet-Delbos, L., Lainey, E., Fenneteau, O., Bonnet, D., Fiette, L., Emilie, D., Bachelier, F., Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood*, 2012, 119, 5722-5730.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., Bachelier, F., The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 2005a, 280, 35760-35766.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., Nicolas, J.F., Latger-Cannard, V., Bensoussan, D., Bordigoni, P., Baleux, F., Le Deist, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*, 2005b, 105, 2449-2457.
- Balabanian, K., Levoye, A., Klemm, L., Lagane, B., Hermine, O., Harriague, J., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest*, 2008, 118, 1074-1084.
- Balkwill, F., The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14, 171-179.
- Barbieri, F., Bajetto, A., Florio, T., Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target. *J Oncol*, 2010, 2010, 426956.

- Barker, B.L., Benovic, J.L., G protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylation of hip regulates internalization of the chemokine receptor CXCR4. *Biochemistry*, 2011, 50, 6933-6941.
- Beaussant Cohen, S., Fenneteau, O., Plouvier, E., Rohrlisch, P.S., Daltroff, G., Plantier, I., Dupuy, A., Kerob, D., Beaupain, B., Bordignon, P., Fouyssac, F., Delezoide, A.L., Devouassoux, G., Nicolas, J.F., Bensaid, P., Bertrand, Y., Balabanian, K., Chantelot, C.B., Bachelier, F., Donadieu, J., Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7, 71.
- Becker, T.C., Coley, S.M., Wherry, E.J., Ahmed, R., Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *J Immunol*, 2005, 174, 1269-1273.
- Bendall, L.J., Basnett, J., Role of sphingosine 1-phosphate in trafficking and mobilization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*, 2013, 20, 281-288.
- Benoist, C., Mathis, D., Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4, a007021. doi: 10.1101/cshperspect.a007021
- Berberich, S., Forster, R., Pabst, O., The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. *Blood*, 2007, 109, 4627-4634.
- Bernardini, G., Sciume, G., Bosisio, D., Morrone, S., Sozzani, S., Santoni, A., CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood*, 2008, 111, 3626-3634.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., Weber, C., MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 2007, 13, 587-596.
- Berson, J.F., Long, D., Doranz, B.J., Rucker, J., Jirik, F.R., Doms, R.W., A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol*, 1996, 70, 6288-6295.
- Bhandari, D., Robia, S.L., Marchese, A., The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction. *Mol Biol Cell*, 2009, 20, 1324-1339.
- Biajoux, V., Bignon, A., Bouchet-Delbos, L., Emilie, D., Balabanian, K., [Dysfunctions of the CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 signaling axis in the WHIM syndrome and the idiopathic CD4(+) T-cell lymphocytopenia]. *Biol Aujourd'hui*, 2010, 204, 273-284.
- Biajoux, V., Bignon, A., Freitas, C., Martinez, V., Thelen, M., Lima, G., Jakez-Ocampo, J., Emilie, D., Llorente, L., Balabanian, K., Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic lupus erythematosus. *J Transl Med*, 2012, 10, 251.
- Bignon, A., Biajoux, V., Bouchet-Delbos, L., Emilie, D., Lortholary, O., Balabanian, K., [CXCR4, a therapeutic target in rare immunodeficiencies?]. *Med Sci (Paris)*, 2011, 27, 391-397.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., Springer, T.A., The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 1996a, 382, 829-833.
- Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., Springer, T.A., A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 1996b, 184, 1101-1109.
- Bleul, C.C., Schultze, J.L., Springer, T.A., B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med*, 1998, 187, 753-762.
- Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., Mackay, C.R., The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 1925-1930.
- Boisvert, J., Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Keeffe, E.B., Butcher, E.C., Greenberg, H.B., Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *J Hepatol*, 2003, 38, 67-75.
- Bromley, S.K., Mempel, T.R., Luster, A.D., Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol*, 2008, 9, 970-980.
- Broxmeyer, H.E., Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15, 49-58.
- Broxmeyer, H.E., Kohli, L., Kim, C.H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Shaheen, M., Li, X., Clapp, D.W., Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol*, 2003, 73, 630-638.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., Benovic, J.L., Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*, 2010, 285, 7805-7817.
- Calderon, L., Boehm, T., Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108, 7517-7522.
- Campbell, D.J., Kim, C.H., Butcher, E.C., Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev*, 2003, 195, 58-71.
- Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K., Fest, T., CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J Immunol*, 2009, 182, 7595-7602.
- Caruz, A., Samsom, M., Alonso, J.M., Alcami, J., Baleux, F., Virelizier, J.L., Parmentier, M., Arenzana-Seisdedos, F., Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett*, 1998, 426, 271-278.
- Chappaz, S., Finke, D., The IL-7 signaling pathway regulates lymph node development independent of peripheral lymphocytes. *J Immunol*, 2010, 184, 3562-3569.
- Chen, C.Y., Chen, Y.H., Lin, H.C., Chen, S.F., Increased risk of adverse pregnancy outcomes for hospitalisation of women with lupus during pregnancy: a nationwide population-based study. *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28, 49-55.
- Chong, B.F., Mohan, C., Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13, 1147-1153.
- Chow, K.Y., Brotin, E., Ben Khalifa, Y., Carthagena, L., Teissier, S., Danckaert, A., Galzi, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Thierry, F., Bachelerie, F., A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell Host Microbe*, 2010, 8, 523-533.
- Chu, V.T., Berek, C., The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev*, 2013, 251, 177-188.
- Contento, R.L., Molon, B., Boullaran, C., Pozzan, T., Manes, S., Marullo, S., Viola, A., CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 10101-10106.
- Corsiero, E., Bombardieri, M., Manzo, A., Bugatti, S., Ugucioni, M., Pitzalis, C., Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett*, 2012, 145, 62-67.
- Crump, M.P., Gong, J.H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., Clark-Lewis, I., Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*, 1997, 16, 6996-7007.
- Cyster, J.G., Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23, 127-159.
- Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S.A., Ngo, V.N., Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev*, 2000, 176, 181-193.
- Dale, D.C., Bolyard, A.A., Kelley, M.L., Westrup, E.C., Makaryan, V., Aprikyan, A., Wood, B., Hsu, F.J., The CXCR4 antagonist plerixafor is a potential therapy for myelokathexis, WHIM syndrome. *Blood*, 2011, 118, 4963-4966.
- Dar, A., Kollet, O., Lapidot, T., Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*, 2006, 34, 967-975.
- Daridon, C., Blassfeld, D., Reiter, K., Mei, H.E., Giesecke, C., Goldenberg, D.M., Hansen, A., Hostmann, A., Frolich, D., Dorner, T., Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12, R204.
- Decailot, F.M., Kazmi, M.A., Lin, Y., Ray-Saha, S., Sakmar, T.P., Sachdev, P., CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*, 2011, 286, 32188-32197.
- Deenick, E.K., Ma, C.S., The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology*, 2011, 134, 361-367.
- Deichmann, M., Kronenwett, R., Haas, R., Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptors CXCR-4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1997, 89, 3522-3528.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Del Real, G., Jimenez-Baranda, S., Lacalle, R.A., Mira, E., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Carrera, A.C., Martinez, A.C., Manes, S., Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J Exp Med*, 2002, 196, 293-301.
- Delgado, M.B., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Langen, H., Thelen, M., Baggiolini, M., Wolf, M., Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol*, 2001, 31, 699-707.
- Deng, Y., Tsao, B.P., Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6, 683-692.
- Deshmukh, U.S., Bagavant, H., Fu, S.M., Role of anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Autoimmun Rev*, 2006, 5, 414-418.
- Diamond, B., Volpe, B.T., A model for lupus brain disease. *Immunol Rev*, 2012, 248, 56-67.
- Ding, L., Morrison, S.J., Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 2013, 495, 231-235.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., Morrison, S.J., Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 2012, 481, 457-462.
- Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., Nagengast, W.B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E.G., Walenkamp, A.M., A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*, 2013, 49, 219-230.
- Dotta, L., Tassone, L., Badolato, R., Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med*, 2011, 11, 317-325.
- Drury, L.J., Ziarek, J.J., Gravel, S., Veldkamp, C.T., Takekoshi, T., Hwang, S.T., Heveker, N., Volkman, B.F., Dwinell, M.B., Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108, 17655-17660.
- Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D., Jain, R.K., CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res*, 2011, 17, 2074-2080.
- Este, J.A., Cabrera, C., De Clercq, E., Struyf, S., Van Damme, J., Bridger, G., Skerlj, R.T., Abrams, M.J., Henson, G., Gutierrez, A., Clotet, B., Schols, D., Activity of different bicyclam derivatives against human immunodeficiency virus depends on their interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol Pharmacol*, 1999, 55, 67-73.
- Fan, J., Heller, N.M., Gorospe, M., Atasoy, U., Stellato, C., The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy. *Eur Respir J*, 2005, 26, 933-947.
- Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N.P., Gerard, C., Sodroski, J., Choe, H., Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*, 1999, 96, 667-676.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., McHeyzer-Williams, M.G., Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*, 2009, 30, 324-335.
- Fedyk, E.R., Ryyan, D.H., Ritterman, I., Springer, T.A., Maturation decreases responsiveness of human bone marrow B lineage cells to stromal-derived factor 1 (SDF-1). *J Leukoc Biol*, 1999, 66, 667-673.
- Fermas, S., Gonnet, F., Sutton, A., Charnaux, N., Mulloy, B., Du, Y., Baleux, F., Daniel, R., Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology*, 2008, 18, 1054-1064.
- Ferreiros-Vidal, I., Carroll, T., Taylor, B., Terry, A., Liang, Z., Bruno, L., Dharmalingam, G., Khadayate, S., Cobb, B.S., Smale, S.T., Spivakov, M., Srivastava, P., Petretto, E., Fisher, A.G., Merkenschlager, M., Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood*, 2013, 121, 1769-1782.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., Lipp, M., CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 1999, 99, 23-33.
- Foussat, A., Balabanian, K., Amara, A., Bouchet-Delbos, L., Durand-Gasselien, I., Baleux, F., Couderc, J., Galanaud, P., Emilie, D., Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 2001, 31, 350-359.
- Gaibelet, G., Planchenault, T., Mazeret, S., Dumas, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lopez, A., Lagane, B., Bachelier, F., CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: a

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach. *J Biol Chem*, 2006, 281, 37921-37929.
- Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., Gropman, J.E., The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 1998, 273, 23169-23175.
- Garnica, M.R., Souto, J.T., Silva, J.S., de Andrade, H.F., Jr., Stromal cell derived factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1alpha and CXCR4 receptor blocker. *Immunol Lett*, 2002, 83, 47-53.
- Gerrits, H., van Ingen Schenau, D.S., Bakker, N.E., van Disseldorp, A.J., Strik, A., Hermens, L.S., Koenen, T.B., Krajnc-Franken, M.A., Gossen, J.A., Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis*, 2008, 46, 235-245.
- Gleichmann, M., Gillen, C., Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter, R., Auer, J., Muller, H.W., Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci*, 2000, 12, 1857-1866.
- Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F., Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol*, 1999, 19, 389-429.
- Gouwy, M., Schiraldi, M., Struyf, S., Van Damme, J., Uguccioni, M., Possible mechanisms involved in chemokine synergy fine tuning the inflammatory response. *Immunol Lett*, 2012, 145, 10-14.
- Gouwy, M., Struyf, S., Catusse, J., Proost, P., Van Damme, J., Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J Leukoc Biol*, 2004, 76, 185-194.
- Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Rot, A., Thelen, M., The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett*, 2012, 145, 30-38.
- Grove, J., Marsh, M., The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol*, 2011, 195, 1071-1082.
- Gulino, A.V., WHIM syndrome: a genetic disorder of leukocyte trafficking. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2003, 3, 443-450.
- Gulino, A.V., Moratto, D., Sozzani, S., Cavadini, P., Otero, K., Tassone, L., Imberti, L., Pirovano, S., Notarangelo, L.D., Soresina, R., Mazzolari, E., Nelson, D.L., Badolato, R., Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*, 2004, 104, 444-452.
- Gunn, M.D., Ngo, V.N., Ansel, K.M., Ekland, E.H., Cyster, J.G., Williams, L.T., A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, 1998, 391, 799-803.
- Gupta, S.K., Lysko, P.G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., Stadel, J.M., Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, 1998, 273, 4282-4287.
- Gupta, S.K., Pillarisetti, K., Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J Immunol*, 1999, 163, 2368-2372.
- Habasque, C., Aubry, F., Jegou, B., Samson, M., Study of the HIV-1 receptors CD4, CXCR4, CCR5 and CCR3 in the human and rat testis. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8, 419-425.
- Halkias, J., Melichar, H.J., Taylor, K.T., Ross, J.O., Yen, B., Cooper, S.B., Winoto, A., Robey, E.A., Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *J Clin Invest*, 2013, 123, 2131-2142.
- Handisurya, A., Schellenbacher, C., Reininger, B., Koszik, F., Vyhnanek, P., Heitger, A., Kirnbauer, R., Forster-Waldl, E., A quadrivalent HPV vaccine induces humoral and cellular immune responses in WHIM immunodeficiency syndrome. *Vaccine*, 2010, 28, 4837-4841.
- Hansell, C.A., Hurson, C.E., Nibbs, R.J., DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? *Immunol Cell Biol*, 2011, 89, 197-206.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., Cyster, J.G., A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med*, 2001, 194, 45-56.
- Hartmann, T.N., Burger, J.A., Glodek, A., Fujii, N., Burger, M., CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*, 2005, 24, 4462-4471.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Hattermann, K., Mentlein, R., An Infernal Trio: The chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. *Ann Anat*, 2013, 195, 103-110.
- Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., Manz, R.A., Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol*, 2002, 169, 1277-1282.
- Hayashi, H., Kume, T., Forkhead transcription factors regulate expression of the chemokine receptor CXCR4 in endothelial cells and CXCL12-induced cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367, 584-589.
- Heesen, M., Berman, M.A., Hopken, U.E., Gerard, N.P., Dorf, M.E., Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms. *J Immunol*, 1997, 158, 3561-3564.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A., Werb, Z., Rafii, S., Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 2002, 109, 625-637.
- Henderson, R.B., Gryl, K., Vehlow, A., de Bettignies, C., Zachacz, A., Henley, T., Turner, M., Batista, F., Tybulewicz, V.L., A novel Rac-dependent checkpoint in B cell development controls entry into the splenic white pulp and cell survival. *J Exp Med*, 2010, 207, 837-853.
- Henson, P.M., Dampening inflammation. *Nat Immunol*, 2005, 6, 1179-1181.
- Hentges, F., B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin Exp Immunol*, 1994, 97 Suppl 1, 3-9.
- Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., Diaz, G.A., Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*, 2003, 34, 70-74.
- Herrera, C., Morimoto, C., Blanco, J., Mallol, J., Arenzana, F., Lluís, C., Franco, R., Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 2001, 276, 19532-19539.
- Hickstein, D.D., West, R.R., A WHIM-sical zebrafish. *Blood*, 2010, 116, 2621-2622.
- Hisano, Y., Nishi, T., Kawahara, A., The functional roles of SIP in immunity. *J Biochem*, 2012, 152, 305-311.
- Hitchon, C., Wong, K., Ma, G., Reed, J., Lyttle, D., El-Gabalawy, H., Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2002, 46, 2587-2597.
- Honczarenko, M., Douglas, R.S., Mathias, C., Lee, B., Ratajczak, M.Z., Silberstein, L.E., SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells. *Blood*, 1999, 94, 2990-2998.
- Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A.M., Silberstein, L.E., Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*, 2006, 24, 1030-1041.
- Hosoe, N., Miura, S., Watanabe, C., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Oyama, T., Fujiyama, Y., Nagata, H., Ishii, H., Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286, G458-466.
- Hosoya-Ohmura, S., Lin, Y.H., Herrmann, M., Kuroha, T., Rao, A., Moriguchi, T., Lim, K.C., Hosoya, T., Engel, J.D., An NK and T cell enhancer lies 280 kilobase pairs 3' to the gata3 structural gene. *Mol Cell Biol*, 2011, 31, 1894-1904.
- Huber, T.B., Reinhardt, H.C., Exner, M., Burger, J.A., Kerjaschki, D., Saleem, M.A., Pavenstadt, H., Expression of functional CCR and CXCR chemokine receptors in podocytes. *J Immunol*, 2002, 168, 6244-6252.
- Hunn, J., Rodriguez, G.C., Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol*, 2012, 55, 3-23.
- Iikura, M., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Kawasaki, H., Matsushima, K., Kitaura, M., Morita, Y., Yoshie, O., Yamamoto, K., Hirai, K., Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J Leukoc Biol*, 2001, 70, 113-120.
- Inlay, M.A., Bhattacharya, D., Sahoo, D., Serwold, T., Seita, J., Karsunky, H., Plevritis, S.K., Dill, D.L., Weissman, I.L., Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev*, 2009, 23, 2376-2381.
- Itkin, T., Lapidot, T., SDF-1 keeps HSC quiescent at home. *Blood*, 2011, 117, 373-374.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Janowski, M., Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr*, 2009, 3, 243-249.
- Jenne, C.N., Enders, A., Rivera, R., Watson, S.R., Bankovich, A.J., Pereira, J.P., Xu, Y., Roots, C.M., Beilke, J.N., Banerjee, A., Reiner, S.L., Miller, S.A., Weinmann, A.S., Goodnow, C.C., Lanier, L.L., Cyster, J.G., Chun, J., T-bet-dependent SIP5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J Exp Med*, 2009, 206, 2469-2481.
- Kallikourdis, M., Trovato, A.E., Anselmi, F., Sarukhan, A., Roselli, G., Tassone, L., Badolato, R., Viola, A., The CXCR4 mutations in WHIM syndrome impair the stability of the T cell immunological synapse. *Blood*, 2013.
- Kamiyama, H., Yoshii, H., Tanaka, Y., Sato, H., Yamamoto, N., Kubo, Y., Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*, 2009, 386, 23-31.
- Kanayama, N., Cascalho, M., Ohmori, H., Analysis of marginal zone B cell development in the mouse with limited B cell diversity: role of the antigen receptor signals in the recruitment of B cells to the marginal zone. *J Immunol*, 2005, 174, 1438-1445.
- Kataru, R.P., Kim, H., Jang, C., Choi, D.K., Koh, B.I., Kim, M., Gollamudi, S., Kim, Y.K., Lee, S.H., Koh, G.Y., T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. *Immunity*, 2011, 34, 96-107.
- Kawai, T., Choi, U., Cardwell, L., DeRavin, S.S., Naumann, N., Whiting-Theobald, N.L., Linton, G.F., Moon, J., Murphy, P.M., Malech, H.L., WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4. *Blood*, 2007, 109, 78-84.
- Kawai, T., Malech, H.L., WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol*, 2009, 16, 20-26.
- Keeley, E.C., Mehrad, B., Strieter, R.M., Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res*, 2011, 317, 685-690.
- Kessenbrock, K., Dau, T., Jenne, D.E., Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89, 23-28.
- Khurana, S., Margamuljana, L., Joseph, C., Schouteden, S., Buckley, S.M., Verfaillie, C.M., Glypican-3-mediated inhibition of CD26 by TFPI: a novel mechanism in hematopoietic stem cell homing and maintenance. *Blood*, 2013, 121, 2587-2595.
- Klein Wolterink, R.G., Garcia-Ojeda, M.E., Vosshenrich, C.A., Hendriks, R.W., Di Santo, J.P., The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation. *Immunol Rev*, 2010, 238, 126-137.
- Kolaczowska, E., Kubes, P., Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13, 159-175.
- Koltowska, K., Betterman, K.L., Harvey, N.L., Hogan, B.M., Getting out and about: the emergence and morphogenesis of the vertebrate lymphatic vasculature. *Development*, 2013, 140, 1857-1870.
- Kovacs, B., Parry, R.V., Ma, Z., Fan, E., Shivers, D.K., Freiberg, B.A., Thomas, A.K., Rutherford, R., Rumbley, C.A., Riley, J.L., Finkel, T.H., Ligation of CD28 by its natural ligand CD86 in the absence of TCR stimulation induces lipid raft polarization in human CD4 T cells. *J Immunol*, 2005, 175, 7848-7854.
- Kowalska, M.A., Ratajczak, J., Hoxie, J., Brass, L.F., Gewirtz, A., Poncz, M., Ratajczak, M.Z., Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol*, 1999, 104, 220-229.
- Kryczek, I., Lange, A., Mottram, P., Alvarez, X., Cheng, P., Hogan, M., Moons, L., Wei, S., Zou, L., Machelon, V., Emilie, D., Terrassa, M., Lackner, A., Curiel, T.J., Carmeliet, P., Zou, W., CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res*, 2005, 65, 465-472.
- Kunkel, E., Butcher, E., Homeostatic chemokines and the targeting of regional immunity. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 512, 65-72.
- Kunkel, E.J., Boisvert, J., Murphy, K., Vierra, M.A., Genovese, M.C., Wardlaw, A.J., Greenberg, H.B., Hodge, M.R., Wu, L., Butcher, E.C., Campbell, J.J., Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol*, 2002, 160, 347-355.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Kury, P., Greiner-Petter, R., Cornely, C., Jurgens, T., Muller, H.W., Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells. *J Neurosci*, 2002, 22, 7586-7595.
- Lagane, B., Chow, K.Y., Balabanian, K., Levoye, A., Harriague, J., Planchenault, T., Baleux, F., Gunera-Saad, N., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*, 2008, 112, 34-44.
- Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F., Lortat-Jacob, H., Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr Res*, 2008, 343, 2018-2023.
- Lambe, T., Crawford, G., Johnson, A.L., Crockford, T.L., Bouriez-Jones, T., Smyth, A.M., Pham, T.H., Zhang, Q., Freeman, A.F., Cyster, J.G., Su, H.C., Cornall, R.J., DOCK8 is essential for T-cell survival and the maintenance of CD8+ T-cell memory. *Eur J Immunol*, 2011, 41, 3423-3435.
- Lambeir, A.M., Proost, P., Durinx, C., Bal, G., Senten, K., Augustyns, K., Scharpe, S., Van Damme, J., De Meester, I., Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem*, 2001, 276, 29839-29845.
- Lanier, L.L., Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8, 259-268.
- Lapid, K., Glait-Santar, C., Gur-Cohen, S., Canaani, J., Kollet, O., Lapidot, T., Egress and Mobilization of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A Dynamic Multi-facet Process. 2008. In StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.91.1.
- Lee, E., Han, J., Kim, K., Choi, H., Cho, E.G., Lee, T.R., CXCR7 mediates SDF1-induced melanocyte migration. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26, 58-66.
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., Lagane, B., CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 2009, 113, 6085-6093.
- Liang, Z., Brooks, J., Willard, M., Liang, K., Yoon, Y., Kang, S., Shim, H., CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359, 716-722.
- Liao, D., Emerging roles of the EBF family of transcription factors in tumor suppression. *Mol Cancer Res*, 2009, 7, 1893-1901.
- Lim, J.K., Murphy, P.M., Chemokine control of West Nile virus infection. *Exp Cell Res*, 2011, 317, 569-574.
- Lin, G., Baribaud, F., Romano, J., Doms, R.W., Hoxie, J.A., Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol*, 2003, 77, 931-942.
- Lipfert, J., Odemis, V., Wagner, D.C., Boltze, J., Engele, J., CXCR4 and CXCR7 form a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013.
- Liu, J., Liao, S., Huang, Y., Samuel, R., Shi, T., Naxerova, K., Huang, P., Kamoun, W., Jain, R.K., Fukumura, D., Xu, L., PDGF-D improves drug delivery and efficacy via vascular normalization, but promotes lymphatic metastasis by activating CXCR4 in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2011, 17, 3638-3648.
- Liu, Q., Chen, H., Ojode, T., Gao, X., Anaya-O'Brien, S., Turner, N.A., Ulrick, J., DeCastro, R., Kelly, C., Cardones, A.R., Gold, S.H., Hwang, E.I., Wechsler, D.S., Malech, H.L., Murphy, P.M., McDermott, D.H., WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. *Blood*, 2012, 120, 181-189.
- Liu, Y.L., Yu, J.M., Song, X.R., Wang, X.W., Xing, L.G., Gao, B.B., Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5, 1320-1326.
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., Moser, B., Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*, 1994, 269, 232-237.
- Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., Cyster, J.G., 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*, 2000, 97, 12694-12699.
- Luttrell, L.M., Gesty-Palmer, D., Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev*, 2010, 62, 305-330.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., Springer, T.A., Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, 9448-9453.
- Machelon, V., Gaudin, F., Camilleri-Broet, S., Nasreddine, S., Bouchet-Delbos, L., Pujade-Lauraine, E., Alexandre, J., Gladieff, L., Arenzana-Seisdedos, F., Emilie, D., Prevot, S., Broet, P., Balabanian, K., CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells. *BMC Cancer*, 2011, 11, 97.
- Marchese, A., Benovic, J.L., Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem*, 2001, 276, 45509-45512.
- Markovic, J., Grdovic, N., Dinic, S., Karan-Djurasevic, T., Uskokovic, A., Arambasic, J., Mihailovic, M., Pavlovic, S., Poznanovic, G., Vidakovic, M., PARP-1 and YY1 are important novel regulators of CXCL12 gene transcription in rat pancreatic beta cells. *PLoS One*, 2013, 8, e59679.
- Marodon, G., Desjardins, D., Mercey, L., Baillou, C., Parent, P., Manuel, M., Caux, C., Bellier, B., Pasqual, N., Klatzmann, D., High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c^{-/-} mice. *Eur J Immunol*, 2009, 39, 2136-2145.
- Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J.E., Cyster, J.G., A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol*, 2000, 1, 298-304.
- Matsumoto, A., Nakayama, K.I., Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830, 2335-2344.
- Mayol, K., Biajoux, V., Marvel, J., Balabanian, K., Walzer, T., Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood*, 2011, 118, 4863-4871.
- Mazo, I.B., Massberg, S., von Andrian, U.H., Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol*, 2011, 32, 493-503.
- Mbemba, E., Saffar, L., Gattegno, L., Role of N-glycans and SDF-1alpha on the coassociation of CD4 with CXCR4 at the plasma membrane of monocytic cells and blood lymphocytes. *FEBS Lett*, 2002, 514, 209-213.
- Mc Guire, P.J., Cunningham-Rundles, C., Ochs, H., Diaz, G.A., Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol*, 2010, 135, 412-421.
- McColl, S.R., Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80, 489-496.
- McDermott, D.H., Liu, Q., Ulrick, J., Kwatema, N., Anaya-O'Brien, S., Penzak, S.R., Filho, J.O., Priel, D.A., Kelly, C., Garofalo, M., Littel, P., Marquesen, M.M., Hilligoss, D., Decastro, R., Fleisher, T.A., Kuhns, D.B., Malech, H.L., Murphy, P.M., The CXCR4 antagonist plerixafor corrects panleukopenia in patients with WHIM syndrome. *Blood*, 2011, 118, 4957-4962.
- McHeyzer-Williams, L.J., McHeyzer-Williams, M.G., Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23, 487-513.
- McHeyzer-Williams, L.J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, M.G., Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21, 266-273.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., McHeyzer-Williams, L., Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12, 24-34.
- McQuibban, G.A., Butler, G.S., Gong, J.H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*, 2001, 276, 43503-43508.
- Minamiguchi, H., Kimura, T., Urata, Y., Miyazaki, H., Bamba, T., Abe, T., Sonoda, Y., Simultaneous signalling through c-mpl, c-kit and CXCR4 enhances the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the PI3-K, PKC and MAPK pathways. *Br J Haematol*, 2001, 115, 175-185.
- Mithal, D.S., Banisadr, G., Miller, R.J., CXCL12 signaling in the development of the nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7, 820-834.
- Mohle, R., Raffi, S., Moore, M.A., The role of endothelium in the regulation of hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells*, 1998, 16 Suppl 1, 159-165.
- Mok, S.W., Proia, R.L., Brinkmann, V., Mabbott, N.A., B cell-specific S1PR1 deficiency blocks prion dissemination between secondary lymphoid organs. *J Immunol*, 2012, 188, 5032-5040.
- Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W., Fauci, A.S., Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol*, 1997, 159, 4322-4329.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Mueller, W., Schutz, D., Nagel, F., Schulz, S., Stumm, R., Hierarchical organization of multi-site phosphorylation at the CXCR4 C terminus. *PLoS One*, 2013, 8, e64975. doi: 10.1371/journal.pone.0064975.
- Murphy, J.W., Cho, Y., Sachpatzidis, A., Fan, C., Hodsdon, M.E., Lolis, E., Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *J Biol Chem*, 2007, 282, 10018-10027.
- Nagasawa, T., Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6, 107-116.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T., Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996a, 382, 635-638.
- Nagasawa, T., Kikutani, H., Kishimoto, T., Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91, 2305-2309.
- Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C.C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T.A., Kishimoto, T., Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996b, 93, 14726-14729.
- Nashi, E., Wang, Y., Diamond, B., The role of B cells in lupus pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42, 543-550.
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H.G., Rot, A., Thelen, M., CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 2010, 5, e9175.
- Ngo, H.T., Leleu, X., Lee, J., Jia, X., Melhem, M., Runnels, J., Moreau, A.S., Burwick, N., Azab, A.K., Roccaro, A., Azab, F., Sacco, A., Farag, M., Sackstein, R., Ghobrial, I.M., SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 2008, 112, 150-158.
- Nie, Y., Han, Y.C., Zou, Y.R., CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*, 2008, 205, 777-783.
- Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Zou, Y.R., The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med*, 2004, 200, 1145-1156.
- Nomiyama, H., Osada, N., Yoshie, O., The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21, 253-262.
- Nomiyama, H., Osada, N., Yoshie, O., Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells*, 2013, 18, 1-16.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., Moser, B., The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 1996, 382, 833-835.
- Odemis, V., Lipfert, J., Kraft, R., Hajek, P., Abraham, G., Hattermann, K., Mentlein, R., Engele, J., The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*, 2012, 60, 372-381.
- Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O., Forster, R., Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*, 2003, 197, 1199-1204.
- Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D.R., Cyster, J.G., Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*, 2002, 196, 65-75.
- Onder, L., Narang, P., Scandella, E., Chai, Q., Iolyeva, M., Hoorweg, K., Halin, C., Richie, E., Kaye, P., Westermann, J., Cupedo, T., Coles, M., Ludewig, B., IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood*, 2012, 120, 4675-4683.
- Pal, K., Mathur, M., Kumar, P., DeFea, K., Divergent beta-arrestin-dependent signaling events are dependent upon sequences within G-protein-coupled receptor C termini. *J Biol Chem*, 2013, 288, 3265-3274.
- Parmo-Cabanas, M., Bartolome, R.A., Wright, N., Hidalgo, A., Drager, A.M., Teixeira, J., Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1alpha-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp Cell Res*, 2004, 294, 571-580.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Parretta, E., Cassese, G., Barba, P., Santoni, A., Guardiola, J., Di Rosa, F., CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow. *J Immunol*, 2005, 174, 7654-7664.
- Patrussi, L., Baldari, C.T., The CXCL12/CXCR4 axis as a therapeutic target in cancer and HIV-1 infection. *Curr Med Chem*, 2011, 18, 497-512.
- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., Lapidot, T., The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 2000, 95, 3289-3296.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., Lapidot, T., Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 1999, 283, 845-848.
- Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, M.G., Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol*, 2010, 11, 1110-1118.
- Penn, M.S., Pastore, J., Miller, T., Aras, R., SDF-1 in myocardial repair. *Gene Ther*, 2012, 19, 583-587.
- Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D.C., Bachelier, F., HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem*, 2003, 278, 3153-3161.
- Pereira, J.P., An, J., Xu, Y., Huang, Y., Cyster, J.G., Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat Immunol*, 2009, 10, 403-411.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., Sandbank, J., Zipori, D., Lapidot, T., G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002, 3, 687-694.
- Pillai, M.M., Yang, X., Balakrishnan, I., Bemis, L., Torok-Storb, B., MiR-886-3p down regulates CXCL12 (SDF1) expression in human marrow stromal cells. *PLoS One*, 2010, 5, e14304.
- Pillai, S., Cariappa, A., Moran, S.T., Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23, 161-196.
- Piot, P., Quinn, T.C., Response to the AIDS pandemic--a global health model. *N Engl J Med*, 2013, 368, 2210-2218.
- Pisetsky, D.S., Grammer, A.C., Ning, T.C., Lipsky, P.E., Are autoantibodies the targets of B-cell-directed therapy? *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7, 551-556.
- Piva, R., Manferdini, C., Lambertini, E., Torreggiani, E., Penolazzi, L., Gambari, R., Pastore, A., Pelucchi, S., Gabusi, E., Piacentini, A., Filardo, G., Facchini, A., Lisignoli, G., Slug contributes to the regulation of CXCL12 expression in human osteoblasts. *Exp Cell Res*, 2011, 317, 1159-1168.
- Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., Taichman, R.S., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Magerus, A., Caruz, A., Fujii, N., Nagler, A., Lahav, M., Szyper-Kravitz, M., Zipori, D., Lapidot, T., Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*, 2000, 106, 1331-1339.
- Popik, W., Hesselgesser, J.E., Pitha, P.M., Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J Virol*, 1998, 72, 6406-6413.
- Post, S., van den Broek, A.J., Rensing, B.J., Pasterkamp, G., Goumans, M.J., Doevendans, P.A., Reduced CD26 expression is associated with improved cardiac function after acute myocardial infarction: insights from the REPERATOR study. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53, 899-905.
- Rahman, A., Isenberg, D.A., Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 2008, 358, 929-939.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A., Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*, 2011, 317, 575-589.
- Rapp, C., Snow, S., Laufer, T., McClendon, C.L., The role of tyrosine sulfation in the dimerization of the CXCR4:SDF-1 complex. *Protein Sci*, 2013. doi: 10.1002/pro.2288.
- Ratajczak, M.Z., Kim, C., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., The expanding family of bone marrow homing factors for hematopoietic stem cells: stromal derived factor 1 is not the only player in the game. *ScientificWorldJournal*, 2012, 2012, 758512.
- Ravindran, A., Sawant, K.V., Sarmiento, J., Navarro, J., Rajarathnam, K., Chemokine CXCL1 dimer is a potent agonist for the CXCR2 receptor. *J Biol Chem*, 2013, 288, 12244-12252.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Raz, E., Mahabaleshwar, H., Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. *Development*, 2009, 136, 1223-1229.
- Rekvig, O.P., Putterman, C., Casu, C., Gao, H.X., Ghirardello, A., Mortensen, E.S., Tincani, A., Doria, A., Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders? *Autoimmun Rev*, 2012, 11, 596-603.
- Richter, R., Casarosa, P., Standker, L., Munch, J., Springael, J.Y., Nijmeijer, S., Forssmann, W.G., Vischer, H.F., Vakili, J., Dethoux, M., Parmentier, M., Leurs, R., Smit, M.J., Significance of N-terminal proteolysis of CCL14a to activity on the chemokine receptors CCR1 and CCR5 and the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Immunol*, 2009, 183, 1229-1237.
- Righi, E., Kashiwagi, S., Yuan, J., Santosuosso, M., Leblanc, P., Ingraham, R., Forbes, B., Edelblute, B., Collette, B., Xing, D., Kowalski, M., Mingari, M.C., Vianello, F., Birrer, M., Orsulic, S., Dranoff, G., Poznansky, M.C., CXCL12/CXCR4 blockade induces multimodal antitumor effects that prolong survival in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res*, 2011, 71, 5522-5534.
- Roozen, P.P., Brugman, M.H., Staal, F.J., Differential requirements for Wnt and Notch signaling in hematopoietic versus thymic niches. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1266, 78-93.
- Roumy, M., Lorenzo, C., Mazeret, S., Bouchet, S., Zajac, J.M., Mollereau, C., Physical association between neuropeptide FF and micro-opioid receptors as a possible molecular basis for anti-opioid activity. *J Biol Chem*, 2007, 282, 8332-8342.
- Rouzaire, P., Mayol, K., Viel, S., Bienvenu, J., Walzer, T., [Homeostasis of natural killer cells]. *Med Sci (Paris)*, 2012, 28, 403-408.
- Rueda, P., Balabanian, K., Lagane, B., Staropoli, I., Chow, K., Levoye, A., Laguri, C., Sadir, R., Delaunay, T., Izquierdo, E., Pablos, J.L., Lendinez, E., Caruz, A., Franco, D., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., Arenzana-Seisdedos, F., The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*, 2008, 3, e2543.
- Rueda, P., Richart, A., Recalde, A., Gasse, P., Vilar, J., Guerin, C., Lortat-Jacob, H., Vieira, P., Baleux, F., Chretien, F., Arenzana-Seisdedos, F., Silvestre, J.S., Homeostatic and tissue repair defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions. *Circulation*, 2012, 126, 1882-1895.
- Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imbert, A., Lortat-Jacob, H., Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J Biol Chem*, 2001, 276, 8288-8296.
- Saini, V., Marchese, A., Tang, W.J., Majetschak, M., Structural determinants of ubiquitin-CXC chemokine receptor 4 interaction. *J Biol Chem*, 2011, 286, 44145-44152.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*, 2000, 177, 134-140.
- Sanchez-Alcaniz, J.A., Haegel, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., Lopez-Bendito, G., Stumm, R., Marin, O., Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron*, 2011, 69, 77-90.
- Sanchez-Madrid, F., del Pozo, M.A., Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J*, 1999, 18, 501-511.
- Sanchez-Martin, L., Sanchez-Mateos, P., Cabanas, C., CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med*, 2013, 19, 12-22.
- Santiago, B., Baleux, F., Palao, G., Gutierrez-Canas, I., Ramirez, J.C., Arenzana-Seisdedos, F., Pablos, J.L., CXCL12 is displayed by rheumatoid endothelial cells through its basic amino-terminal motif on heparan sulfate proteoglycans. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8, R43.
- Santiago, B., Calonge, E., Del Rey, M.J., Gutierrez-Canas, I., Izquierdo, E., Usategui, A., Galindo, M., Alami, J., Pablos, J.L., CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine*, 2011, 53, 184-190.
- Savino, W., Mendes-da-Cruz, D.A., Silva, J.S., Dardenne, M., Cotta-de-Almeida, V., Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol*, 2002, 23, 305-313.
- Schiraldi, M., Raucci, A., Munoz, L.M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., Thelen, M., Varani, L., Mellado, M., Proudfoot, A., Bianchi, M.E., Ugucioni, M., HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med*, 2012, 209, 551-563.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Schmidt, T.H., Bannard, O., Gray, E.E., Cyster, J.G., CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches. *J Exp Med*, 2013, 210, 1099-1107.
- Schmitt, N., Chene, L., Boutolleau, D., Nugeyre, M.T., Guillemard, E., Versmisse, P., Jacquemot, C., Barre-Sinoussi, F., Israel, N., Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4⁺ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J Virol*, 2003, 77, 5784-5793.
- Schmutz, S., Bosco, N., Chappaz, S., Boyman, O., Acha-Orbea, H., Ceredig, R., Rolink, A.G., Finke, D., Cutting edge: IL-7 regulates the peripheral pool of adult ROR gamma⁺ lymphoid tissue inducer cells. *J Immunol*, 2009, 183, 2217-2221.
- Scholten, D.J., Canals, M., Maussang, D., Roumen, L., Smit, M.J., Wijtmans, M., de Graaf, C., Vischer, H.F., Leurs, R., Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol*, 2012, 165, 1617-1643.
- Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C., Bernhagen, J., A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett*, 2009, 583, 2749-2757.
- Sehgal, A., Ricks, S., Boynton, A.L., Warrick, J., Murphy, G.P., Molecular characterization of CXCR-4: a potential brain tumor-associated gene. *J Surg Oncol*, 1998, 69, 239-248.
- Shen, Z., Tan, Y., Wu, J., Jiang, S., [The difference of intracellular cytokines produced by different lymphocyte subsets of cord blood and adult peripheral blood]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2001, 22, 288-291.
- Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Liu, H.Y., Mukai, R., Kitamura, T., Hoshino, H., A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*, 2000, 74, 619-626.
- Shioda, T., Kato, H., Ohnishi, Y., Tashiro, K., Ikegawa, M., Nakayama, E.E., Hu, H., Kato, A., Sakai, Y., Liu, H., Honjo, T., Nomoto, A., Iwamoto, A., Morimoto, C., Nagai, Y., Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, 6331-6336.
- Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R.J., Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 2013, 497, 137-141.
- Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P.J., Tran, T., Brass, L.F., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Holmes, W., Dallas, W., Luther, M.A., Wells, T.N., Hoxie, J.A., Marsh, M., Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol*, 1997, 139, 651-664.
- Stein, J.V., Nombela-Arrieta, C., Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology*, 2005, 116, 1-12.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M., Germain, R.N., Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*, 2002, 296, 1873-1876.
- Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A., Lopez-Larrea, C., Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 741, 152-170.
- Sun, W., Jiao, Y., Cui, B., Gao, X., Xia, Y., Zhao, Y., Immune complexes activate human endothelium involving the cell-signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis. *Lab Invest*, 2013, 93, 626-638.
- Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Broden, T., Marquez, G., Agace, W.W., CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*, 2002, 110, 1113-1121.
- Szpakowska, M., Fievez, V., Arumugan, K., van Nuland, N., Schmit, J.C., Chevigne, A., Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84, 1366-1380.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., Nagasawa, T., The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 1998, 393, 591-594.
- Takahama, Y., Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6, 127-135.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Tarasova, N.I., Stauber, R.H., Michejda, C.J., Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J Biol Chem*, 1998, 273, 15883-15886.
- Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., Honjo, T., Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 1993, 261, 600-603.
- Teicher, B.A., Fricker, S.P., CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2010, 16, 2927-2931.
- Thelen, M., Munoz, L.M., Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10, 38-43.
- Tokoyoda, K., Radbruch, A., Signals controlling rest and reactivation of T helper memory lymphocytes in bone marrow. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69, 1609-1613.
- Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A.N., Albrecht, I., Grun, J.R., Lohning, M., Radbruch, A., Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity*, 2009, 30, 721-730.
- Tramont, P.C., Tosello-Tramont, A.C., Shen, Y., Duley, A.K., Sutherland, A.E., Bender, T.P., Littman, D.R., Ravichandran, K.S., CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol*, 2010, 11, 162-170.
- Tripathi, A., Saini, V., Marchese, A., Volkman, B.F., Tang, W.J., Majetschak, M., Modulation of the Cxc Chemokine Receptor 4 Agonist Activity of Ubiquitin through C-Terminal Protein Modification. *Biochemistry*, 2013. doi: 10.1021/bi400254f.
- Tsai, J.J., Dudakov, J.A., Takahashi, K., Shieh, J.H., Velardi, E., Holland, A.M., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Young, L.F., Shono, Y., Ghosh, A., Hanash, A.M., Tran, H.T., Moore, M.A., van den Brink, M.R., Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol*, 2013, 15, 309-316.
- Tzeng, Y.S., Li, H., Kang, Y.L., Chen, W.C., Cheng, W.C., Lai, D.M., Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 2011, 117, 429-439.
- Valenzuela-Fernandez, A., Planchenault, T., Baleux, F., Staropoli, I., Le-Barillec, K., Leduc, D., Delaunay, T., Lazarini, F., Virelizier, J.L., Chignard, M., Pidard, D., Arenzana-Seisdedos, F., Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem*, 2002, 277, 15677-15689.
- Verhofstede, C., Nijhuis, M., Vandekerckhove, L., Correlation of coreceptor usage and disease progression. *Curr Opin HIV AIDS*, 2012, 7, 432-439.
- Vicente-Manzanares, M., Montoya, M.C., Mellado, M., Frade, J.M., del Pozo, M.A., Nieto, M., de Landazuri, M.O., Martinez, A.C., Sanchez-Madrid, F., The chemokine SDF-1alpha triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1998, 28, 2197-2207.
- Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F., Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4, 110-122.
- Victoria, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., Nussenzweig, M.C., Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*, 2012, 120, 2240-2248.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 2008, 9, 503-510.
- Voermans, C., van Hennik, P.B., van der Schoot, C.E., Homing of human hematopoietic stem and progenitor cells: new insights, new challenges? *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10, 725-738.
- Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E., Vivier, E., Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol*, 2007, 8, 1337-1344.
- Wang, A., Guilpain, P., Chong, B.F., Chouzenoux, S., Guillevin, L., Du, Y., Zhou, X.J., Lin, F., Fairhurst, A.M., Boudreaux, C., Roux, C., Wakeland, E.K., Davis, L.S., Batteux, F., Mohan, C., Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2010, 62, 3436-3446.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Baldwin, A.S., Jr., TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, 1996, 274, 784-787.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

- Wang, H., Beaty, N., Chen, S., Qi, C.F., Masiuk, M., Shin, D.M., Morse, H.C., 3rd, The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *Blood*, 2012, 119, 465-468.
- Wang, J., Norcross, M., Dimerization of chemokine receptors in living cells: key to receptor function and novel targets for therapy. *Drug Discov Today*, 2008, 13, 625-632.
- Wang, X., Sharp, J.S., Handel, T.M., Prestegard, J.H., Chemokine oligomerization in cell signaling and migration. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 117, 531-578.
- Wegner, S.A., Ehrenberg, P.K., Chang, G., Dayhoff, D.E., Sleeker, A.L., Michael, N.L., Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem*, 1998, 273, 4754-4760.
- Welinder, E., Ahsberg, J., Sigvardsson, M., B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return. *Semin Immunol*, 2011, 23, 335-340.
- Wendel, C., Hemping-Bovenkerk, A., Krasnyanska, J., Mees, S.T., Kochetkova, M., Stoeppler, S., Haier, J., CXCR4/CXCL12 participate in extravasation of metastasizing breast cancer cells within the liver in a rat model. *PLoS One*, 2012, 7, e30046.
- Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C., Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 2010, 330, 1066-1071.
- Yu, S., Crawford, D., Tsuchihashi, T., Behrens, T.W., Srivastava, D., The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev Dyn*, 2011, 240, 384-393.
- Zhang, Y., Foudi, A., Geay, J.F., Berthebaud, M., Buet, D., Jarrier, P., Jalil, A., Vainchenker, W., Louache, F., Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 2004, 22, 1015-1029.
- Zhi, L., Kim, P., Thompson, B.D., Pitsillides, C., Bankovich, A.J., Yun, S.H., Lin, C.P., Cyster, J.G., Wu, M.X., FTY720 blocks egress of T cells in part by abrogation of their adhesion on the lymph node sinus. *J Immunol*, 2011, 187, 2244-2251.
- Ziarek, J.J., Veldkamp, C.T., Zhang, F., Murray, N.J., Kartz, G.A., Liang, X., Su, J., Baker, J.E., Linhardt, R.J., Volkman, B.F., Heparin oligosaccharides inhibit chemokine (CXC motif) ligand 12 (CXCL12) cardioprotection by binding orthogonal to the dimerization interface, promoting oligomerization, and competing with the chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4) N terminus. *J Biol Chem*, 2013, 288, 737-746.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., Homey, B., Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11, 597-606.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 2012, 36, 705-716.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.M., Smyth, M.J., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med*, 2010, 207, 365-378.
- Zuelzer, W.W., "Myelokathexis"- a New Form of Chronic Granulocytopenia. Report of a Case. *N Engl J Med*, 1964, 270, 699-704.

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

ANNEXES

I- Autres publications

S1PR5 is pivotal for the homeostasis of patrolling monocytes

Emilie Debien^{*1,2,3}, Katia Mayol^{*1,2,3}, Vincent Biajoux^{4,5},
Cécile Daussy^{1,2,3}, Mercedes Gomez De Agüero^{1,2,3}, Morgan Taillardet^{1,2,3},
Nicolas Dagany^{1,2,3}, Lilia Brinza^{1,2,3}, Thomas Henry^{1,2,3},
Bertrand Dubois^{1,2,3}, Dominique Kaiserlian^{1,2,3}, Jacqueline Marvel^{1,2,3},
Karl Balabanian^{4,5} and Thierry Walzer^{1,2,3}

¹ Université de Lyon, France

² INSERM U1111, Lyon, France

³ Université Lyon1, UMS3444 / US8, Lyon, France

⁴ Univ. Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie", UMR_S996, Clamart, France

⁵ INSERM, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart, France

Patrolling Ly6C⁻ monocytes are blood-circulating cells that play a role in inflammation and in the defense against pathogens. Here, we show that similar to natural killer (NK) cells, patrolling monocytes express high levels of S1PR5, a G-coupled receptor for sphingosine-1 phosphate. We found that *S1pr5*^{-/-} mice lack peripheral Ly6C⁻ monocytes but have a normal number of these cells in the bone marrow (BM). Various lines of evidence exclude a direct contribution of S1PR5 in the survival of Ly6C⁻ monocytes at the periphery. Rather, our data support a role for S1PR5 in the egress of Ly6C⁻ monocytes from the BM. In particular, we observed a reduced frequency of patrolling monocytes in BM sinusoids of S1PR5 KO mice. Unexpectedly, S1P was not a chemoattractant for patrolling monocytes and had no significant effect on their viability *in vitro*. Moreover, the disruption of S1P gradients *in vivo* did not alter Ly6C⁻ monocyte trafficking and viability. These data suggest that S1PR5 regulates the trafficking of monocytes via a mechanism independent of S1P gradients.

Keywords: Bone marrow · Patrolling monocytes · Sphingosine-1 phosphate · Survival · Trafficking

Introduction

Blood monocytes are bone marrow (BM) derived phagocytic cells that play an important role in innate immunity against different classes of pathogens [1]. Human and mouse monocytes have been subdivided into at least two subsets on the basis of expression of

CD14 and CD16 (human) and Ly6C (mouse) and several functional, migratory [2] and transcriptomic [3–5] parameters.

Mouse Ly6C⁺ monocytes are classical inflammatory monocytes, equivalent to human CD14⁺ CD16⁻ monocytes, as recently confirmed by gene profiling experiments [4, 5]. They are rapidly recruited to inflamed tissues in response to CC chemokine

Correspondence: Dr. Thierry Walzer
e-mail: thierry.walzer@inserm.fr

*These authors contributed equally to this work.

Receptor 2 (CCR2) [6] or CCR6 [7] ligands. During infection by various pathogens (intracellular bacteria, parasites, or viruses), they differentiate into TNF/iNOS producing dendritic cells (Tip-DCs) that produce large amounts of TNF- α , reactive oxygen species, and nitric oxide [8]. They can also differentiate into other types of DCs in other inflammatory contexts [9]. Moreover, Ly6C⁺ monocytes are involved in atherosclerosis and can also differentiate into macrophages or myeloid suppressor cells [2].

The role of Ly6C⁻ monocytes remains more elusive. Ly6C⁻ monocytes express high levels of CX₃CR1, which allows them to patrol healthy tissues through long-range crawling on the surface of blood endothelium at the luminal side [10], in response to membrane-anchored endothelial CX₃CL1 [11]. This interaction is also required for their survival [11]. They express low levels of CCR2 and migrate less efficiently to inflamed tissues than inflammatory monocytes [12]. They have been proposed to be precursors of resident macrophage populations [13]. Moreover, their human equivalent, the CD16⁺CD14^{dim} monocytes respond to virus infection through TLR7 and TLR8 (where TLR is Toll-like receptor) and produce TNF- α , IL-1 β , and CC chemokine Ligand 3 (CCL3) [4]. A recent article also reported that Ly6C⁻ monocytes were uniquely equipped with high levels of Fc γ receptors involved in antibody-dependent cell cytotoxicity such as Fc γ R1 and Fc γ R4 [14]. Finally, they could also have a role in tissue repair and angiogenesis [13].

Monocytes are produced in the BM from macrophage-DC precursor [13]. Upon development, monocytes reach the blood circulation via BM sinusoids. Egress of Ly6C⁺ monocytes from BM has been shown to be dependent on CCR2. This egress is weak under steady-state conditions but increases massively upon inflammation induced by bacterial infection [6]. During infections, low concentrations of TLR ligands in the bloodstream drive CCR2-dependent emigration of monocytes from the BM. BM mesenchymal stem cells and CXC chemokine ligand 12 abundant reticular cells rapidly express CCL2 in response to TLR ligands or bacterial infection and induce monocyte egress into the blood [15]. How Ly6C⁻ monocytes reach the peripheral blood is however still unknown.

Here, we report that Ly6C⁻ monocytes expressed high levels of sphingosine-1 phosphate receptor 5 (S1PR5), previously involved in BM egress of natural killer (NK) cells [16]. *S1pr5*^{-/-} mice lack peripheral Ly6C⁻ monocytes. Our data support a role for S1PR5 together with CCR2 in their egress from the BM. Modulation of extracellular S1P levels did not affect monocyte trafficking to the blood while it reduced T-cell egress from lymphoid organs, showing that S1P receptors regulate the trafficking of monocytes and lymphocytes using different mechanisms.

Results

S1PR5 is required for the presence of Ly6C⁻ monocytes in the periphery

We measured using quantitative RT-PCR the expression of all S1PR in different lymphocyte and monocyte populations sorted by flow cytometry from the BM. S1PR5 showed the highest expres-

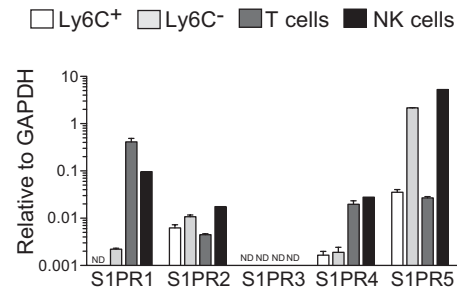


Figure 1. Expression of S1P receptors in different immune cell types. Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes, NK cells, and T cells were sorted by flow cytometry from the BM and their mRNA expression of S1P receptors was measured using semi quantitative RT-PCR, relative to GAPDH. Results are representative of two independent FACS sorting experiments and show the mean + SD of triplicate PCRs for each S1P receptor.

sion in monocyte subsets. S1PR5 was expressed 30 times higher in Ly6C⁻ monocytes than in Ly6C⁺ monocytes (Fig. 1). A similar difference in S1PR5 expression between monocyte subsets has been measured using microarrays by the Immgen consortium (<http://www.immgen.org/databrowser/index.html>) [17]. S1PR5 levels in Ly6C⁻ monocytes were comparable to those in NK cells (Fig. 1), in which S1PR5 plays a role in BM egress [16].

To investigate the function of S1PR5 in monocytes, we first compared the percentage of monocyte subsets in the blood of wild-type (WT) and *S1pr5*^{-/-} mice [18] by flow cytometry. Results in Figure 2A–C showed a significant reduction of Ly6C⁻ monocytes in the blood of *S1pr5*^{-/-} mice. This reduction was observed both in *S1pr5*^{-/-} female (Fig. 2A and B) and male mice (Fig. 2C). *S1pr5*^{+/-} heterozygous mice also showed a mild phenotype (Fig. 2B). A strong reduction in the frequency of Ly6C⁻ monocytes was also observed in the spleen, which is known to be an important reservoir for this subset [19] (Fig. 2D), in the lymph nodes and in non-lymphoid organs such as the lung, liver, and kidney (Fig. 2E). By contrast, the percentage of Ly6C⁻ monocytes appeared normal in the BM of *S1pr5*^{-/-} mice (Fig. 2F). Moreover, the percentage of Ly6C⁺ monocytes was normal in all lymphoid organs of *S1pr5*^{-/-} mice tested (Fig. 2, all panels).

To test if the role of S1PR5 in monocytes was cell-intrinsic, we generated mixed BM chimeras by reconstituting lethally irradiated mice with equal amounts of BM from WT (CD45.1⁺) and *S1pr5*^{-/-} (CD45.2⁺) mice. Six weeks after reconstitution, we measured CD45.1 and CD45.2 expression in different immune subsets in the blood and BM, and calculated the corresponding *S1pr5*^{-/-} to WT ratio for each subset. As previously reported [20], for mature NK (mNK) cells, this ratio was very high in the BM and very low in the blood (Fig. 3, left panel), reflecting the important role of S1PR5 in NK cell exit from the BM. For Ly6C⁺ monocytes, the *S1pr5*^{-/-} to WT ratio was nearly 1 in both blood and BM (Fig. 3, right panel), confirming the absence of a role of S1PR5 in this

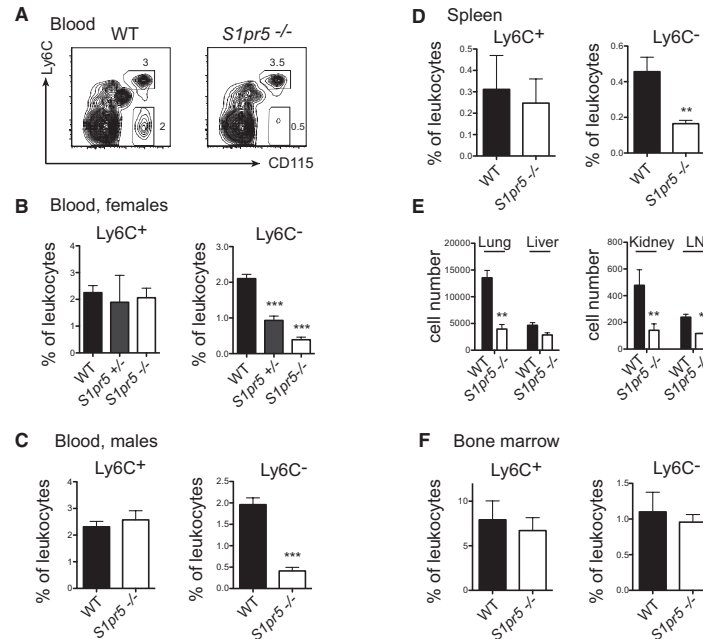


Figure 2. *S1pr5*^{-/-} mice lack peripheral Ly6C⁻ monocytes. (A–F) Flow cytometric analyses of the percentage or absolute number of Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes in (A–C) the blood, (D) the spleen, (E) lung, liver, kidney, lymph nodes, and (F) the BM of WT and *S1pr5*^{-/-} mice, as indicated. (A) A representative flow cytometric analysis in the blood of WT and *S1pr5*^{-/-} mice is shown. (C–F) Data are shown as the mean + SD percentage or absolute number of monocyte subsets among total leukocytes in groups of 5 (spleen) to 20 (blood and BM) age- and sex-matched mice, and are pooled from three experiments performed. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, t-test.

subset. By contrast, for Ly6C⁻ monocytes, the *S1pr5*^{-/-} to WT ratio was near 0.5 in the BM and 0.1 in the blood (Fig. 3, left panel). These data suggest that S1PR5 is important both for the development of Ly6C⁻ monocytes and for their trafficking or their survival at the periphery.

S1PR5 and CCR2 but not CX₃CR1 are essential for localization of Ly6C⁻ monocytes to BM sinusoids

The paucity of patrolling monocytes in the periphery of *S1pr5*^{-/-} mice could be explained by a role of this receptor either in their egress from the BM or in their survival at the periphery. To try and discriminate between both hypotheses, we performed a series of experiments using *Cx₃Cr1^{sfv/sfv}* and *Ccr2*^{-/-} mice as controls. Indeed, CX₃CR1 has been shown to regulate peripheral survival of patrolling monocytes but is devoid of chemotactic activity involved in BM egress. Reciprocally, CCR2 is essential for monocyte egress from the BM but is not involved in their survival. The distribution of Ly6C⁻ monocytes in *Cx₃Cr1^{sfv/sfv}* and *Ccr2*^{-/-} mice is in fact very similar to that of *S1pr5*^{-/-} mice, with a near normal frequency

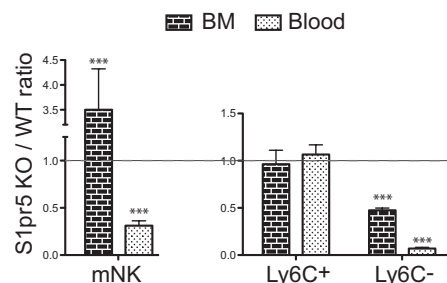


Figure 3. The role of S1PR5 in Ly6C⁻ monocytes is cell-intrinsic. Mixed BM chimeric mice were generated by reconstituting irradiated CD45.1 × CD45.2 mice with a 1:1 mixture of WT CD45.1 BM cells and *S1pr5*^{-/-} CD45.2 BM cells as indicated. Eight weeks after reconstitution, the percentage of CD45.2 positive cells in the indicated subsets was measured by flow cytometry in the blood and BM. Results are shown as the mean + SD of four mice in each group and are expressed as the ratio between *S1pr5*^{-/-} and WT cells for each subset, as indicated. This experiment is representative of four independent experiments performed. ****p* < 0.001, t-test.

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

1670 Emilie Debien et al.

Eur. J. Immunol. 2013, 43: 1667–1675

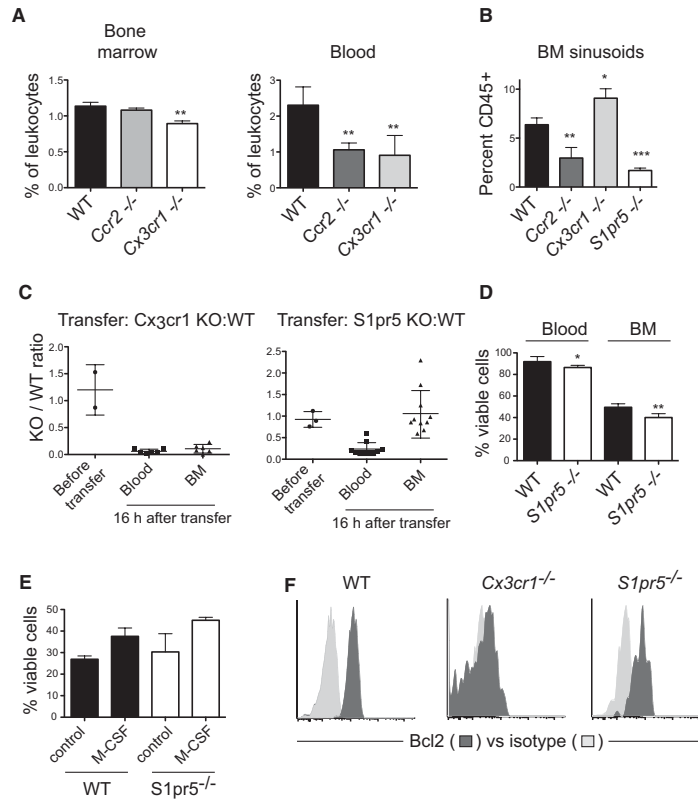


Figure 4. S1PR5 promotes BM egress of Ly6C⁻ monocytes and not survival. (A) Flow cytometric analyses of the percentage of Ly6C⁻ monocytes in the blood and the BM of WT, *Cx3cr1^{gfp/gfp}* and *Ccr2^{-/-}* mice. Data are shown as the mean + SD of 4–10 mice in each group. (B) In some experiments, the frequency of sinusoidal cells (CD45⁺) within total BM Ly6C⁻ monocytes was measured. Data are shown as mean + SD of five mice in each group. (A, B) Data shown are pooled from three experiments performed. (C) Adoptive transfer of BM cells from *Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice and CD45.1 WT mice or *S1pr5^{-/-}* and CD45.1 WT mice (1:1 ratio) into CD45.1 × CD45.2 recipient mice. Sixteen hours after transfer the number of Ly6C⁻ monocytes from each donor was measured in the BM and blood of recipient mice by flow cytometry. Results are expressed as a ratio between KO and CD45.1 WT Ly6C⁻ monocytes, for each combination, before and after transfer in the BM and blood. Each symbol represents an individual recipient mouse. Data are pooled from three independent experiments. (D) Freshly isolated blood and BM cells from WT *S1pr5^{-/-}* chimeric mice were stained with Annexin V and 7-AAD and antibodies to detect monocyte cells. The frequency of viable Ly6C⁻ monocytes was determined by flow cytometry. Data are shown as the mean + SD percentage of viable Annexin V⁻ 7-AAD⁻ cells among total Ly6C⁻ monocytes of each donor mouse in the BM and blood. Results are representative of three independent experiments with at least three mice in each group. (E) Ly6C⁻ monocytes were sorted from BM cell suspensions by flow cytometry and cultured for 24 h in medium alone or supplemented with M-CSF as indicated. Data are shown as the mean ± SD viability of cells as assessed by Annexin V / 7-AAD staining and are pooled from three independent experiments. (F) Flow cytometric measurement of intracellular Bcl2 expression in blood Ly6C⁻ monocytes from different mouse strains as indicated. Data are representative of *n* = 3 mice in each group. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, t-test.

in the BM and a low frequency of these cells at the periphery (Fig. 4A).

First, we compared the frequency of sinusoidal Ly6C⁻ monocytes in the BM of WT, *Cx3cr1^{gfp/gfp}*, *Ccr2^{-/-}*, and *S1pr5^{-/-}* mice using *in vivo* labeling of sinusoidal cells. This measurement has been shown to be proportional to the BM exit rate. Indeed,

newly developed BM leukocytes transit from the BM parenchyma through the endothelium and into the BM sinusoids where they are transiently retained until their release into the blood circulation. Results presented in Fig. 4B showed that the percentage of sinusoidal Ly6C⁻ monocytes was significantly decreased in the BM of *S1pr5^{-/-}* or *Ccr2^{-/-}* mice compared to the BM of WT mice.

By contrast, the percentage of sinusoidal Ly6C⁻ monocytes was significantly increased in the BM of *Cx3cr1^{flp/flp}* mice compared to the BM of WT mice. These results support a role for S1PR5 in the migration of Ly6C⁻ monocytes from the parenchyma to the sinusoidal compartment of the BM, a process essential for exit from the BM. This process could be negatively regulated by CX₃CR1, perhaps as a result of adhesive properties of CX₃CR1.

Second, we compared the fate of monocytes of different genotypes adoptively transferred into recipient mice. We performed intravenous injection of a 1:1 mixture of WT (CD45.1) and *S1pr5^{-/-}* or *Cx3cr1^{flp/flp}* (CD45.2) BM cells into recipient WT (CD45.1 × CD45.2) mice. Sixteen hours after transfer, we measured the frequency of donor monocyte subsets in the blood and the BM of recipient mice. We calculated the ratio between WT and KO donors for each subset before transfer and 16 h after transfer in the blood and the BM. *Cx3cr1^{flp/flp}* Ly6C⁻ monocytes were barely detectable in both BM and blood of recipient mice, confirming the important role of CX₃CR1 in the survival of Ly6C⁻ monocytes (Fig. 4C, left panel). By contrast, transferred *S1pr5^{-/-}* Ly6C⁻ monocytes were almost absent from the blood but were represented at similar frequency as WT Ly6C⁻ monocytes in the BM of recipient mice (Fig. 4C, right panel). These data support a role for S1PR5 in the egress of Ly6C⁻ monocytes rather than in their survival.

Third, we compared the ex vivo viability of WT and *S1pr5^{-/-}* Ly6C⁻ monocytes in the blood and BM of WT *S1pr5^{-/-}* chimeric mice using AnnexinV/7-AAD staining. In both compartments, the viability of *S1pr5^{-/-}* Ly6C⁻ monocytes was slightly lower than that of WT Ly6C⁻ monocytes (Fig. 4D). Moreover, irrespective of the mouse genotype, the viability of Ly6C⁻ monocytes was lower in the BM than in the blood. We also assessed viability of WT and *S1pr5^{-/-}* Ly6C⁻ monocytes sorted by flow cytometry and cultured in the presence or absence of M-CSF. After 24 h, the viability of WT and *S1pr5^{-/-}* Ly6C⁻ monocytes was similar in both culture conditions (Fig. 4E). Finally, we measured the expression of Bcl2, an important anti-apoptotic molecule that has been shown to be down regulated in *Cx3cr1^{flp/flp}* Ly6C⁻ monocytes and to regulate their survival. The expression of Bcl2 was similar in Ly6C⁻ monocytes from WT and *S1pr5^{-/-}* mice but it was reduced in *Cx3cr1^{flp/flp}* Ly6C⁻ monocytes (Fig. 4F), as previously reported [21].

Altogether, this series of in vivo experiments demonstrate that CX₃CR1 and S1PR5 regulate homeostasis of the peripheral pool of Ly6C⁻ monocytes via different mechanisms. While CX₃CR1 is clearly involved in their survival, S1PR5 is rather implicated in their egress from the BM although it may also contribute indirectly in their survival.

Modulation of S1P levels does not alter the trafficking and survival of Ly6C⁻ monocytes

Finally, we investigated the role of S1P in the physiology of Ly6C⁻ monocytes using in vitro and in vivo experiments.

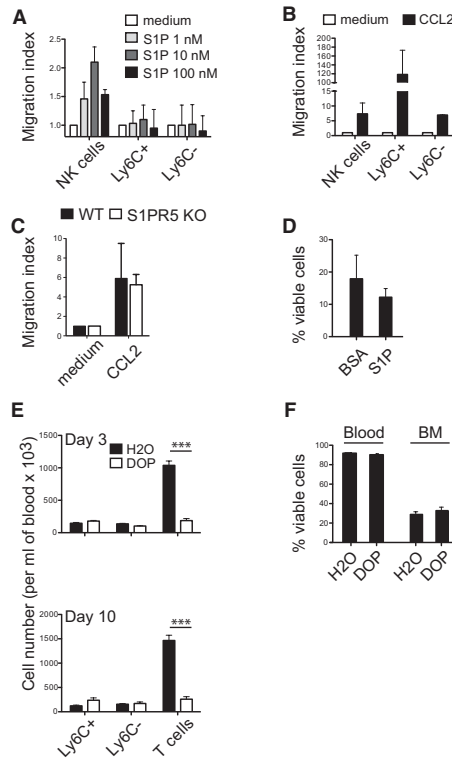


Figure 5. S1P gradient is not required for homeostasis of Ly6C⁻ monocytes. (A and B) Transwell migration assay of purified Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes or NK cells (A) in response to different concentrations of S1P or (B) in response to CCL2 (50 ng/ml) as indicated. Values are reported as the mean ratio +SD between the number of cells that migrated during the 2 h incubation with S1P or CCL2 and the number of cells migrating in the control (no chemokine) condition. Results are representative of three independent experiments. (C) Transwell migration of BM Ly6C⁻ monocytes from WT and *S1pr5^{-/-}* mice in response to CCL2 gradients, as indicated. (D) Ly6C⁻ monocytes were sorted from BM cell suspensions by flow cytometry and cultured for 24 h in medium without FCS supplemented with BSA, in the presence or absence of S1P, as indicated. Data are shown as mean + SD of six samples pooled from three independent experiments. (E and F) C57BL/6 mice were treated with DOP given in the drinking water for 3 or 10 days. (E) The percentage of Ly6C⁺ and Ly6C⁻ monocytes and the percentage of CD3⁺ T cells was measured on days 3 (top) and 10 (bottom) by flow cytometry. (F) The viability of Ly6C⁻ monocytes was measured after 3 days of treatment in the BM and in the blood. Results are shown as the mean + SD of six mice in each group and are pooled from three experiments performed. ****p* < 0.001, *t*-test.

In vitro, we measured responsiveness of monocytes to S1P gradients in chemotaxis chambers. No consistent migration of either population of monocytes was observed (Fig. 5A), whereas both monocyte populations migrated in response to CCL2 gradients (Fig. 5B). In the same experiments, NK cells migrated in response

to both S1P and CCL2 gradients (Fig. 5A and B), as previously reported [16]. WT and *S1pr5*^{-/-} Ly6C⁻ monocytes migrated equally to CCL2 gradients, excluding a possible cross talk between CCR2 and S1PR5 (Fig. 5C). We also cultured Ly6C⁻ monocytes with S1P at concentrations similar to those observed in vivo. The addition of S1P at any concentration did not change monocyte viability in vitro (Fig. 5D and data not shown).

Next, we treated mice with the sphingosine lyase inhibitor deoxyphosphorylcholine (DOP), which has been shown to dramatically increase S1P levels in tissues and disrupt S1P gradients in vivo [22]. Upon treatment with DOP, peripheral T-cell numbers dropped, as previously reported [22]. However, DOP had no effect on the trafficking or the number of Ly6C⁻ monocytes (Fig. 5E) and NK cells [22] even after prolonged (10 days) treatment (Fig. 5E). The ex vivo viability of blood and BM Ly6C⁻ monocytes was not modified either (Fig. 5F).

Altogether, these results suggest that S1P and S1P gradients are not involved in monocyte survival and unexpectedly not in their trafficking.

Discussion

In this article, we report for the first time a high expression of S1PR5 in patrolling monocytes and the paucity of these cells in the peripheral compartment of *S1pr5*^{-/-} mice. The following body of evidences supports a role for S1PR5 in BM egress of patrolling monocytes: (i) We previously showed that S1PR5 was involved in NK-cell egress from the BM to blood [20, 23]. Moreover, several other members of the family of S1P receptors (S1PR1, S1PR3) are clearly involved in egress of different leukocyte subsets from central and peripheral lymphoid organs [24]. (ii) Ly6C⁻ monocytes are reduced in BM sinusoids of *S1pr5*^{-/-} mice, whereas they are preserved, or even slightly increased in *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice, which only exhibit impaired survival of Ly6C⁻ monocytes at the periphery. (iii) The phenotype of *S1pr5*^{-/-} mice is very similar to that of *Ccr2*^{-/-} mice in which monocyte egress from the BM has been shown to be clearly impaired [15]. In particular, the number of Ly6C⁻ monocytes was normal in the BM of *S1pr5*^{-/-} and *Ccr2*^{-/-} mice but reduced in the blood circulation and in BM sinusoids. (iv) Upon adoptive transfer into recipient mice, *S1pr5*^{-/-} Ly6C⁻ monocytes recirculate to the BM and rapidly disappear from the blood circulation. For comparison, *Cx3cr1*^{gfp/gfp} Ly6C⁻ monocytes do not survive either in the BM or in the blood after transfer.

An intriguing observation is the absence of accumulation of *S1pr5*^{-/-} Ly6C⁻ monocytes in the BM of *S1pr5*^{-/-} mice or WT *S1pr5*^{-/-} BM chimeric mice. A similar phenomenon (i.e. lack of accumulation of Ly6C⁻ monocytes) was also observed in *Ccr2*^{-/-} mice and WT *Ccr2*^{-/-} BM chimeric mice. This suggests that the trafficking machinery of Ly6C⁻ monocytes regulates somehow the developmental fitness of these cells and that an impairment of this machinery results in an impaired survival. As a matter of fact, we found that the ex vivo viability of Ly6C⁻ monocytes in the BM was very low, confirming previous findings [25]. It is therefore possible that an impairment of their trafficking by means of CCR2

or S1PR5 deletion could further decrease the viability of these fragile cells.

In vivo modulation of S1P levels by pharmacological means did not alter homeostasis of Ly6C⁻ monocytes (this report), while they dramatically reduced the number of T cells in circulation. These results show that S1P receptors operate through different modes of action in monocytes and in T cells. Several hypotheses could explain this paradox. First, the role of S1PR5 in Ly6C⁻ monocytes could be S1P-independent. Other physiological ligands for this receptor have not yet been described but specific S1PR5 analogs binding with high affinity to this receptor have been synthesized [26], and may therefore exist in vivo. Second, it has been reported that S1PR5 could act as a constitutively active receptor [27] like other G-protein-coupled receptors [28]. S1PR5 was in fact shown to decrease adenylyl cyclase and ERK activity in several cell lines in the absence of S1P, inducing cell rounding and detachment without promoting apoptosis [27]. This effect could contribute or even induce cell migration by preventing strong attachment to the stromal substrate of the BM. In this scenario, S1PR5 would not be a chemotactic receptor in monocytes, which would explain why we could not detect migration of these cells in response to S1P gradients in vitro. An alternative possibility could be that the form of S1P physiologically active in monocytes is different from the one we use in vitro. In fact, S1P can be found under different forms in vivo that could have differential activities on leukocyte subsets. Further studies are required to test these points. It remains also to be determined whether S1PR5 acts differently in monocytes and NK cells. Indeed, *S1pr5*^{-/-} mice lack both peripheral NK cells and Ly6C⁻ monocytes but only NK cells accumulate in the BM of these mice and migrate in vitro in response to S1P.

Altogether, our findings shed light on the long-sought mechanisms of exit of Ly6C⁻ monocytes from the BM [12, 29]. They also show fundamental differences between both monocyte subsets, as the exit of Ly6C⁺ monocytes from the BM relies only on pro-inflammatory signals mediated by CCR2 [6] whereas that of Ly6C⁻ monocytes is primarily mediated by S1PR5. Furthermore, *S1pr5*^{-/-} mice constitute an interesting model to study the role of Ly6C⁻ monocytes in immunity, a point that remains unclear.

Materials and methods

Mice and reagents

WT C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). *S1pr5*^{-/-} mice [18], *Ccr2*^{-/-} [30], and *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice [31] have been previously described. In some experiments, we also used C57BL/6 CD45.1 mice or C57BL/6 CD45.1 × CD45.2 mice that were bred in our animal house. Female mice 8–24 week-old were used unless specified. DOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) was provided in the drinking water (30 µg/mL) supplemented with glucose. Experimental procedures

and mice housing were approved by the local Ethics Committee and carried out according to the French and European laws.

carried out on a FACS Canto, a FACS Canto II or a FACS LSR II (Becton Dickinson).

Generation of BM chimera

C57BL/6 CD45.1 × CD45.2 mice were irradiated twice at 450 rad within a 4-h interval. Four hours after the last irradiation, they received an intravenous injection of a 1:1 mixture of BM cells from WT CD45.1 and *S1pr5*^{-/-} CD45.2 mice. BM chimeras were analyzed 6–12 weeks after reconstitution.

In vivo labeling of sinusoidal lymphocytes

This technique was previously described [32]. Briefly, mice were injected intravenously with 1 μg anti-CD45 Mab (30F11) coupled to phycoerythrin (PE) or PE-cyanin-5 (BD Biosciences, San Jose, USA). Mice were sacrificed 2 min after antibody injection. BM was then collected and analyzed by flow cytometry.

Adoptive transfers

BM cells from WT CD45.1 and *S1pr5*^{-/-} or *Cx3cr1*^{sfp/sfp} (CD45.2) mice were prepared and mixed at a 1:1 ratio before intravenous injection (1×10^7 cells of each genotype in PBS) into anesthetized CD45.1 × CD45.2 C57BL/6 mice. Sixteen hours later, mice were sacrificed, blood and bone marrow was collected and the percentage of monocyte subsets of each donor mice was measured by flow cytometry after staining for CD45.1 and CD45.2 expression.

Cell viability

Cell viability was measured in ex vivo isolated cell suspensions using Annexin V and 7-AAD staining (BD Biosciences) and flow cytometry.

Antibodies and flow cytometry

BM, spleen, lung, lymph node, kidney, and blood cells were isolated and stained as previously described [33]. Cell counts were determined using an accuri C6 flow cytometer (BD Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA). Monocytes were identified as CD115⁺ in the blood or as CD11b⁺CD11c^{low}NK1.1⁻CD19⁻Ly6G⁻ in the BM and spleen. The following Mabs from eBioscience (San Diego, CA, USA) or BD Biosciences (Becton Dickinson, San Jose, USA) were used: anti-CD115 (AFS98), anti-Ly6C (HK1.4), anti-Ly6G (1A8), anti-CD19 (ebio1D3), anti-CD3 (145–2C11), anti-NK1.1 (PK136), anti-NKp46 (29A1.4), anti-CD11b (M1/70), anti-CD45.1 (A20), anti CD45.2 (104), and relevant isotype controls. Bcl2 expression was measured using a commercial kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry was

Chemotaxis assays

For S1P migration assays, monocytes were purified from BM cells using a negative selection procedure. Briefly, freshly isolated BM cells were stained with purified antibodies against CD4, CD8, CD19, and Ly6G (eBioscience). Cells were then incubated with magnetic beads covered with goat anti-rat IgG (Qiagen, Hilden, Germany) before magnetic separation. After washing steps, cells were then suspended in RPMI1640 supplemented with 4 mg/mL fatty acid-free bovine albumin (Sigma). The same medium was used to prepare S1P (Sigma) at 10^{-8} M or CCL2 at 50 ng/mL (R&D systems). Cell migration was measured in Transwell chambers (Costar, Cambridge, MA, USA) with 5-μm pore-width polycarbonate filters. After 2 h, transmigrated cells were stained for CD3, NK1.1, CD27 and CD11b or CD11b, Ly6G and Ly6C and counted by flow cytometry as described previously [16].

Quantitative RT-PCR

Lymphocyte or monocyte subsets stained with the appropriate antibodies were sorted using a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson). RNA was extracted with the RNeasy micro kit (Qiagen), which includes treatment with DNase I. We used Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to generate cDNA for RT-PCR. PCR was carried out with a SybrGreen-based kit (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche, Basel, Switzerland) on a StepOne plus instrument (Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA). Primers were designed using the oligo-perfect software (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The following primers were used: *S1pr1* (F: AAATGCCCAACGGAGACTCTG, R: TTGCTGCGGCTAAATCCATGC), *S1pr2* (F: CCCAAGTCGGGACATAGA, R: ACAGCCAGTGGTGGTTTGTG), *S1pr3* (F: TCAGTGTTTCATCATGTGG, R: CAGGTCTTCCTTGACCTTCG), *S1pr4* (F: AAGACCAGCCGTGTGTATGG, R: TCAGCACGGTGTGAGTAGC), *S1pr5* (F: GCCTGGTGCCTACTGCTACAG, R: CCTCCGTGCTG-GCTATTTC), *Gapdh* (F: GCATGGCCTTCCGTGTTTC, R: TGTCAT-CATACCTGGCAGGTTTCT). S1PR expression level in the different cell subsets was normalized to GAPDH expression levels.

In vitro culture of Ly6C⁻ monocytes

Ly6C⁻ monocytes were sorted by flow cytometry using a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson). They were cultured in flat bottom 96 well plates (25000/condition) in duplicates. For cultures with M-CSF, the culture medium was supplemented with 10% FCS in the presence or absence of 5% of an M-CSF-containing cell culture supernatant. In some experiments, cells were resuspended in medium supplemented with 4 mg/mL fatty acid-free bovine albumin (Sigma). The same medium was used to prepare S1P

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

1674 Emilie Debien et al.

Eur. J. Immunol. 2013. 43: 1667–1675

(Sigma), which was added or not to the cultures at a concentration of 10^{-6} M.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using two-tailed *t*-tests or nonparametric tests when appropriate. These tests were run on the Prism software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Levels of significance are expressed as *p*-values ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

Acknowledgments: Authors thank the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, and the flow cytometry facility of the SFR Biosciences Gerland. We also thank Andrew Calver (GlaxoSmithKline) for providing S1PR5 KO mice and Steffen Jung for the CX₃CR1^{gfp/gfp} mice. The T. W. lab is supported by the FINOVI foundation, Agence Nationale de la Recherche (ANR JC sphinks), European Research council (ERC-Stg 281025), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M. and Pamer, E. G., Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. 26: 421–452.
- 2 Auffray, C., Sieweke, M. H. and Geissmann, F., Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27: 669–692.
- 3 Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V. S., Gosselin, A., Zhou, X. and Gabuzda, D., Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16⁺ and CD16⁻ monocyte subsets. *BMC Genomics.* 2009. 10: 403–422.
- 4 Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A. et al., Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010. 33: 375–386.
- 5 Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R. et al., Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010. 115: e10–e19.
- 6 Serbina, N. V. and Pamer, E. G., Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 2006. 7: 311–317.
- 7 Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., Caux, C. et al., Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 2006. 24: 191–201.
- 8 Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. and Pamer, E. G., TNF/INOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 2003. 19: 59–70.
- 9 Tacke, F. and Randolph, G. J., Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 2006. 211: 609–618.
- 10 Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S. et al., Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007. 317: 666–670.
- 11 Kim, K.-W., Vallon-Eberhard, A., Zigmund, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A. et al., In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 2011. 118: e156–e167.
- 12 Shi, C. and Pamer, E. G., Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2011. 11: 762–774.
- 13 Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M. and Ley, K., Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010. 327: 656–661.
- 14 Biburger, M., Aschermann, S., Schwab, I., Lux, A., Albert, H., Danzer, H., Woigk, M. et al., Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. *Immunity* 2011. 35: 932–944.
- 15 Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T. M., Serbina, N. V., Lipuma, L., Leiner, I. et al., Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 2011. 34: 590–601.
- 16 Mayol, K., Biajoux, V., Marvel, J., Balabanian, K. and Walzer, T., Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood* 2011. 118: 4863–4871.
- 17 Heng, T. S. P., Painter, M. W. and Immunological Genome Project Consortium, The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunol.* 2008. 9: 1091–1094.
- 18 Jaillard, C., Harrison, S., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Calver, A. R., Duddy, G., Walsh, F. S. et al., Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J. Neurosci.* 2005. 25: 1459–1469.
- 19 Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Eitzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L. et al., Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009. 325: 612–626.
- 20 Walzer, T., Chiassone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y. B. et al., Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* 2007. 8: 1337–1344.
- 21 Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A. J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M. and Randolph, G. J., Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103⁺ and CD103⁻ pulmonary dendritic cell populations. *J. Immunol.* 2008. 180: 3019–3027.
- 22 Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y. and Cyster, J. G., Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 2005. 309: 1735–1739.
- 23 Jenne, C. N., Enders, A., Rivera, R., Watson, S. R., Bankovich, A. J., Pereira, J. P., Xu, Y. et al., T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* 2009. 206: 2469–2481.
- 24 Cyster, J. G. and Schwab, S. R., Sphingosine-1-Phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2012. 30: 69–94.
- 25 Hanna, R. N., Carlin, L. M., Hubbeling, H. G., Nackiewicz, D., Green, A. M., Punt, J. A., Geissmann, F. et al., The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁻ monocytes. *Nat. Immunol.* 2011. 12: 778–785.

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Eur. J. Immunol. 2013. 43: 1667–1675

Molecular immunology 1675

- 26 Mattes, H., Dev, K. K., Bouhelal, R., Barske, C., Gasparini, F., Guerini, D., Mir, A. K. et al., Design and synthesis of selective and potent orally active S1P5 agonists. *Chem. Med. Chem.* 2010. 5: 1693–1696.
- 27 Niedernberg, A., Blaukat, A., Schöneberg, T. and Kostenis, E., Regulated and constitutive activation of specific signalling pathways by the human S1P5 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2003. 138: 481–493.
- 28 Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. and Kobilka, B. K., The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009. 459: 356–363.
- 29 Ingersoll, M. A., Platt, A. M., Potteaux, S. and Randolph, G. J., Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* 2011. 32: 470–477.
- 30 Boring, L., Gosling, J., Chensue, S. W., Kunkel, S. L., Farese, Jr, R. V., Broxmeyer, H. E. and Charo, I. F., Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 1997. 100: 2552–2561.
- 31 Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A. and Littman, D. R., Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell Biol.* 2000. 20: 4106–4114.
- 32 Pereira, J. P., An, J., Xu, Y., Huang, Y. and Cyster, J. G., Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat. Immunol.* 2009. 10: 403–411.
- 33 Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S. et al., Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007. 104: 3384–3389.

Abbreviations: DOP: deoxypridoxine · S1P: sphingosine-1 phosphate · S1PRS: sphingosine-1 phosphate receptor 5

Full correspondence: Dr. Thierry Walzer, INSERM U1111, 21 avenue Tony Garnier, Lyon, France 69007
Fax: +33-(0) 43728 2341
e-mail: thierry.walzer@inserm.fr

Received: 8/1/2013
Revised: 11/2/2013
Accepted: 15/3/2013
Accepted article online: 20/3/2013

RESEARCH

Open Access

Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic lupus erythematosus

Vincent Biajoux^{1,2†}, Alexandre Bignon^{1,2†}, Christelle Freitas^{1,2}, Valérie Martinez^{1,2,3}, Marcus Thelen⁴,
Guadalupe Lima⁵, Juan Jakez-Ocampo⁵, Dominique Emilie^{1,2,6*}, Luis Llorente⁵ and Karl Balabanian^{1,2*}

Abstract

Background: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterized by B-cell hyper-reactivity and the production of pathogenic anti-nuclear-directed auto-antibodies (Abs). B-cell ontogeny is partly dependent on the CXCL12/CXCR4 axis for which the contribution to SLE pathogenesis remains unclear. CXCR7, the novel receptor for CXCL12, is differentially expressed among memory B-cell subsets. However, its biological role in SLE remains to be explored.

Methods: Relative *CXCR4* and *CXCR7* expression levels were compared by quantitative PCR in leukocytes from blood samples of 41 Mexican Mestizos patients with SLE and 45 ethnicity-matched healthy subjects. Intracellular and membrane expression of both receptors was analyzed by flow cytometry in naive and Ab-secreting B cells. B-cell responsiveness to CXCL12 was investigated using Transwell-based chemotaxis assays. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test for comparisons of values amongst healthy controls and patients with inactive or active SLE, and non-parametrically using the Mann-Whitney *U*-test for multiple comparisons and unpaired samples. Correlations were determined by Spearman's ranking.

Result: SLE leukocytes displayed reduced levels of *CXCR4* and *CXCR7* transcripts. In SLE patients, a significant defect in *CXCR4* expression was detected at the surface of naive and Ab-secreting B cells, associated with an abnormal intracellular localization of the receptor. *CXCR7* predominantly localized in cytosolic compartments of B cells from healthy and SLE individuals. Disease activity did not impact on these expression patterns. Altered receptor compartmentalization correlated with an impaired CXCL12-promoted migration of SLE B cells.

Conclusions: Our data highlight a down-regulation of CXCL12 receptors on circulating B cells from SLE patients that likely influences their migratory behavior and distribution.

Keywords: Autoimmunity, Systemic Lupus Erythematosus, B cells, Chemokines, CXCR4, CXCR7, Migration

Background

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a prototypical chronic and systemic autoimmune disease with heterogeneous clinical manifestations and various immune dysfunctions [1]. Genetic factors play an important role in

the susceptibility to SLE development [2]. Such complex disease affects multiple organs and results in death particularly when kidney damage is severe. SLE is notably characterized by a strong humoral response. A wide array of intrinsic B-cell defects, including B-cell hyper-reactivity and the production of auto-antibodies (Abs) against dsDNA and ribonucleoproteins, has been documented in SLE patients [3,4]. These pathogenic anti-nuclear Abs are thought to agglomerate and form immune complexes, thus leading to organ destruction [5]. Perturbations of peripheral B-cell homeostasis (e.g. increased CD27^{high} plasma cells [PC]), deposition of immune complexes and

* Correspondence: karl.balabanian@u-psud.fr

†Equal contributors

‡Deceased

¹Université Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie", UMR_S996, Clamart, France

²INSERM, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart, France

Full list of author information is available at the end of the article



complement activation further underscore the contribution of B cells to SLE pathogenesis [6-8]. Hence, B-cell targeted therapies such as rituximab and epratuzumab, two humanized monoclonal Abs (mAbs) directed against surface molecules CD20 and CD22 respectively, are of interest for improving current treatments mostly based on non-specific immunosuppressive drugs [7,9].

Chemokines are small cytokine-like secreted proteins that govern migration of leukocytes to specific niches in lymphoid organs and inflammatory sites. They mediate their functions by binding and activating chemokine receptors, which belong to the seven-transmembrane G protein-coupled receptor family [10]. The chemokine system influences the inflammatory development and progression of B-cell mediated autoimmune diseases including SLE [3,11,12]. In this study, we focused on the CXC α -chemokine Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12, which together with its main receptor CXCR4, constitutes the chemokine/receptor axis attracting the greatest level of interest in autoimmunity [13]. Many leukocytes, including B cells, express CXCR4 and CXCL12 is constitutively produced by stromal, epithelial, and endothelial cells notably in lymphoid organs [14,15]. Given its ability to regulate B-cell ontogeny, differentiation and homing, recent attention has been directed to the CXCL12/CXCR4 axis in SLE pathophysiology. CXCL12 is upregulated in the tubules and glomeruli of nephritic kidneys from multiple lupus-prone mouse models (e.g. NZB/W, BXSB, MRL.lpr) and SLE patients as well [13,16,17]. Similarly, CXCR4 hyper-expression or -activity has been reported in various leukocyte subsets of lupus mouse models [13]. Thus, in concert with CXCL12, CXCR4 could be pivotal for leukocyte trafficking into damaged kidneys from mice with lupus nephritis. In SLE patients, the situation is somewhat puzzling, as contradictory results have been reported for CXCR4 expression on peripheral blood lymphocytes. Indeed, some studies have documented down- or up-regulation of CXCR4 expression on SLE B cells, while others failed to detect any change in membrane CXCR4 expression [8,13,16,18]. To our knowledge, there is currently no consensus on CXCR4 expression and its correlation with SLE.

Little if anything is known about the expression and role of CXCR7, the second receptor for CXCL12, in SLE pathogenesis. CXCR7 binds with high affinity to CXCL12 and with lower affinity to Interferon-inducible T-cell Alpha Chemoattractant (I-TAC)/CXCL11, but its signaling capacities are still subject of debate [19,20]. Unlike CXCR4, CXCR7 does not signal through the canonical G α i-protein pathways and thus, is unable to activate conventional signaling events [20]. However, CXCR7 could act as a decoy receptor that is able to clear CXCL12 from the surrounding medium [21-24]. CXCR7 is expressed on multiple cell types including endothelial

and tumor cells and was shown to promote cell survival, adhesion and tumor growth, suggesting a signaling potential for this atypical receptor [19]. This may rely on its reported ability to behave as an endogenous β -arrestin-biased receptor or to complex with CXCR4, forming heterodimers that regulate CXCL12 responsiveness [25-28]. The expression profile of CXCR7 in mouse and human hematopoietic cells was recently disputed [19,29-31]. It appears to be expressed on B cells, tightly regulated during B-cell differentiation and correlated with the capacity of memory B cells to differentiate into Ab-secreting cells, *i.e.* PC, which are increased in the blood of patient with active SLE [6-8,21,30,32,33]. Whether CXCR7 dysregulation characterizes SLE remains to be delineated.

The aim of this study was to examine the expression of CXCR4 and CXCR7, together with CXCL12 responsiveness, in circulating B-cell subsets from Mexican Mestizos SLE patients and age- and ethnicity-matched healthy subjects. Our data reveal that both CXCR4 and CXCR7 are downregulated on SLE B cells.

Methods

Ethics statement

The study was carried out in accordance with good clinical practice guidelines, national laws and the Declaration of Helsinki, and was approved by the Institutional Committee of Biomedical Research (Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos). All patients signed an informed consent.

Patients, sample processing and cell culture

The study included 41 SLE patients (37 women and 4 men) with median age of 36 years (range: 21 to 62) and median disease duration of 8 years (range: 1 to 27) (Table 1). All patients were Mexican Mestizos [34], recruited in the Department of Immunology and Rheumatology of the Hospital "Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán" (Mexico City, Mexico) and fulfilled at least four 1982 American Rheumatism Association revised criteria for SLE [35]. Clinical disease activity was scored using the SLE Disease Activity Index or SLEDAI [36]. 17 patients had inactive disease (SLEDAI \leq 3) and 24 patients with indices above 3 were considered as having active disease as recently reported [37]. The five patients who had neuropsychiatric (NP) or central nervous system (CNS) history were inactive regarding these manifestations at the time of the study. All patients with renal involvement and SLEDAI $>$ 4 had active disease at the time of the study, meaning that most of active patients displayed active renal involvement (n=20). Donors of control leukocytes consisted in age- (median 41.4 years, range: 23 to 60 years) and sex-biased (male/female ratio = 0.6) 45 healthy adult volunteers,

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Biajoux et al. *Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:251
<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/251>

Page 3 of 16

Table 1 Demographic, pathophysiological and treatment characterization of SLE patients

Parameters	Inactive SLE (SLEDAI ≤ 3)	Active SLE (SLEDAI > 3)	P value ^a
Total numbers (n)	17	24	N/A ^b
Age at study (years)			
Median	35	36	0.474
Range	21-62	25-50	
Sex (n)			
Female	15	22	N/A
Male	2	2	N/A
Duration of disease (years)			
Median	8	8	0.577
Range	1-22	1-27	
Clinical parameters (mean ± SD)			
White Blood Cells (x10 ⁹ /L)	5.6 ± 1.8	4.9 ± 1.8	0.218
Clinical signs (n)			
Muco-cutaneous	11	13	N/A
Haematological	8	12	N/A
Neurological/Psychiatric	-	5	N/A
Serositis	-	6	N/A
Renal	6	20	N/A
Joint	12	14	N/A
SLE activity (mean ± SD [range])			
SLEDAI score	0.4 ± 0.2 [0-2]	9.1 ± 3.8 [4-18]***	<0.0001
B-cell subsets (mean ± SEM [range], x10⁶/L)			
Total CD19 ⁺ B cells	554.2 ± 121.9 [54-2077]	319.3 ± 73.9 [6-1303]	0.0585
CD27 ⁻ naive B cells	398.6 ± 104.1 [17.9-1757]	217.1 ± 62.1 [0.7-1205]*	0.0403
Overall CD27 ⁺ B cells	146.2 ± 22.7 [35.1-323.2]	96.6 ± 16.8 [5.3-292.8]	0.0585
CD27 ⁺ memory B cells	127.5 ± 20.1 [30.3-273.6]	82.8 ± 15.2 [1.9-279.3]	0.0534
CD27 ^{high} plasma B cells	19 ± 3.3 [4.9-49.6]	13.9 ± 2.6 [0.9-44.2]	0.0879
Treatment (n)			
None	4	1	N/A
Prednisolone	5	20	N/A
Azathioprine	8	19	N/A
Methotrexate	2	1	N/A
Hydroxychloroquine	6	7	N/A
Mycophenolate Mofetil	2	3	N/A
Cyclophosphamide	-	2	N/A
Leflunomide	-	1	N/A

^aMann-Whitney U-test; ^bN/A: Not Applicable.

among which 13 were referred at the Établissement Français du Sang (Rungis, France) and 32 at the Hospital "Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán". Healthy subjects were seronegative for human immunodeficiency virus, hepatitis B or C virus, without evidence of cancer, congenital heart disease or connective tissue disorder. No differences were detected in CXCL12

receptors expression and function in circulating lymphocytes from both French and Mexican healthy controls.

Within 2 hours after blood sampling either in Mexico or France, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated in a similar fashion from heparin-treated blood samples using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation and

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

then cryopreserved in 1 mL fetal calf serum (FCS) with 10% dimethylsulfoxide. After transportation in France, SLE and healthy PBMC were defrozed by rapid thawing at 37°C in parallel with French samples and immediately transferred to 10 mL FCS. Leukocytes were >90% viable upon thawing, as assessed by trypan-blue exclusion. After washing twice with 10 mL PBS 1X, PBMC were incubated 60 min at 37°C in RPMI medium supplemented with 20 mM HEPES and 0.5% bovine serum albumin (BSA), a step allowing resensitization of chemokine receptors including CXCR4 [38]. As specified in some experiments, whole blood and PBMC were used right after collection. Parental, CXCR4- and CXCR7-transduced HEK 293 T (HEK) cells [29] were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FCS, glucose (4.5 g/L), 10 mM HEPES, penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37°C in humidified air with 5% CO₂.

Real-time RT-PCR analysis

Total cellular RNA was extracted from PBMC samples using the RNeasy Plus Mini kit and genomic DNA (gDNA) Eliminator columns (Qiagen, Courtabouef, France) and reverse transcribed with pd(T)-15 and Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fisher Bioblock, Illkirch, France). RNA quality and integrity were assessed by detecting both 18S and 28S ribosomal RNAs in each sample and using a BioAnalyzer (Agilent), respectively. As determined using the NanoDrop technology, all samples displayed a RNA A260/280 ratio ~ 2.0 and a RNA Integrity Number > 7 and were then processed for gene expression. Amplification of cDNAs (1 µg) was performed by quantitative real-time PCR reactions on a Light Cycler instrument (LC480, Roche Diagnostics, Meylan, France) with the LightCycler 480 SYBR Green detection kit (Roche Diagnostics) using forward (450-467) 5'-GACCGCTACCTGGCCATC-3' and reverse (743-761) 5'-GGCAGCCAACAGGCGAAGA-3' primers for CXCR4 (311 bp), forward (8-29) 5'-TGCA TCTCTTCGACTACTCAGA-3' and reverse (94-113) 5'-GGCATGTTGGGACATCAC-3' primers for CXCR7 (103 bp), and forward (214-223) 5'-GGGTCAGAAGGA TTCCTATG-3' and reverse (432-451) 5'-GGTCTCAAAC ATGATCTGGG-3' primers for β -actin (237 bp). We used the LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics) with the following amplification scheme: 95°C 10 min and 40 cycles: 95°C 20 s, 60°C 15 s, 72°C 20 s. The dissociation curve method was applied according to manufacturer's protocol (60°C to 95°C) to ensure the presence of a single specific PCR product. Relative quantification was performed with the standard curve method as we previously used [33,39]. For each tested gene (*i.e.* CXCR4, CXCR7 or β -actin), standard cDNAs from PHA-stimulated PBMC were amplified along with sample cDNAs in the

same PCR run. Standard curves were generated by the LC480 software (Roche Diagnostics). The threshold fluorescence common for all compared samples was set into the exponential phase of the amplifications. The target mRNA quantity in each sample was determined from the relative standard curve (using sample Ct values) and expressed in arbitrary units (AU) corresponding to the dilution factors of the standard RNA preparation. Amplification efficiency representative for each gene was determined using equation of the standard curve as reported elsewhere [40]. Results were expressed as CXCR4/ β -actin on CXCR7/ β -actin AU ratios. Internal positive controls, consisting in CXCR4- or CXCR7-transduced HEK cells, were run in parallel. We controlled that no gDNA was amplified in all cDNA samples tested using the following intron-spanning primers: forward (939-958) 5'-CACTCCCGCCCAATATACCC-3' and reverse (1218-1237) 5'-ACACACAAGAGGCCAC TCC-3' primers for CXCR4 (298 bp) and forward (353-372) 5'-CTACAGCCACAGAAAGCGGA-3' and reverse (527-546) 5'-GGAAAGGAAAAGTCCAGCG-3' primers for CXCR7 (193 bp).

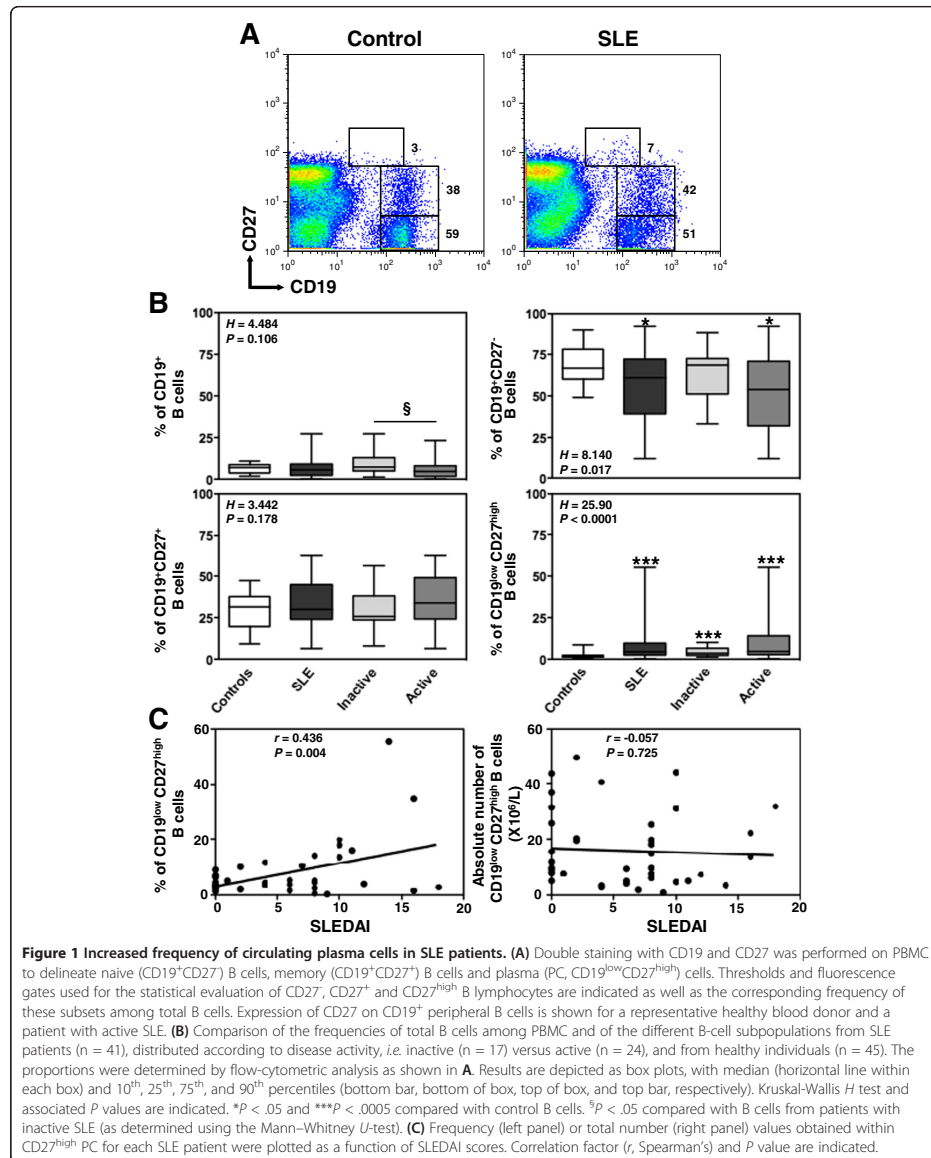
Flow-cytometric analysis

The frequency of each B-cell subset and membrane expression levels of both CXCR4 and CXCR7 were determined by four-color flow-cytometric analysis. For this purpose, PBMC were incubated with the following mAbs (unless specified from BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France): fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD27 (clone M-T271), unconjugated mouse anti-human CXCR7 (clone 9C4) followed by a phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-mouse F(ab')₂ Ab (Dako, Trappes, France) as previously described [29], PE-conjugated mouse anti-human CD38 (clone HIT2) or CXCR7 (clone 11G8, R&D Systems, Lille, France or clone 8F11-M16, BioLegend, San Diego, CA), peridinin chlorophyll protein-Cy5 (PerCP-Cy5)-conjugated mouse anti-human CD19 (clone HIB19), and allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human CXCR4 (clone 12G5) or CD20 (clone 2H7). Isotype- and species-matched Abs were used as negative controls. After wash in PBS 1X, cells were analyzed on a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) using the CellQuest software (BD Biosciences). At least 30,000 events were collected for each analysis after gating on forward and side scatter to select living lymphocytes. The frequencies of naive (CD19⁺CD27⁻), memory (CD19⁺CD27⁺) and plasma (CD19^{low}CD27^{high}) B cells were calculated according to statistical threshold sets in reference of control staining (Figure 1A and Table 1), as previously reported [6]. CXCR4- or CXCR7-transduced HEK cells were used as positive controls for specific staining. To assess total pool of CXCR4 and CXCR7, *i.e.* membrane and intracellular detection, PBMC were incubated with FITC-

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Biajoux et al. *Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:251
<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/251>

Page 5 of 16



conjugated mouse anti-human CD27 and PerCP-Cy5-conjugated mouse anti-human CD19 mAbs, washed twice in PBS 1X, fixed and permeabilized using the BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Cells were subsequently stained with 9C4 and 12G5 mAbs, or the corresponding isotype Ab, at room temperature for 30 min and then analyzed by flow cytometry.

Chemotaxis assays

Chemotaxis was performed using a Transwell assay upon CXCL12 or EBI1-Ligand Chemokine (ELC)/CCL19 induction as previously described [29]. Briefly, 3×10^5 PBMC in 150 μ L RPMI medium supplemented with 20 mM HEPES and 0.5% BSA were added to the upper chamber of a 6.5-mm diameter, 5- μ m pore polycarbonate Transwell culture insert (Corning costar, Brumath, France). The same media (600 μ L) with or without CXCL12 (chemically synthesized by Dr. F. Baleux, Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris, France) or CCL19 (R&D Systems) diluted at various concentrations was placed in the lower chamber. AMD3100 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used at 1 μ M to inhibit CXCR4-dependent signaling. Input leukocytes that migrated to the lower chamber after 2-hour incubation at 37°C in humidified air with 5% CO₂ were collected, stained with CD19, CD20, CD38 and CD27 mAbs, and counted by flow cytometry. The fraction of cells migrating across the polycarbonate membrane was calculated as follows: [(number of cells migrating to the lower chamber in response to chemokine or medium)/(number of cells added to the upper chamber at the start of the assay)] \times 100.

Statistical analysis

Unless specified, all values are expressed as median (25th and 75th percentiles). Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test for comparisons of values amongst at least three groups, *i.e.* healthy controls, patients with inactive or active SLE, when required, and non-parametrically using the Mann-Whitney *U*-test (Prism software, GraphPad, La Jolla, CA) for multiple comparisons and unpaired samples. Correlations were determined by Spearman's ranking. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Altered B-cell distribution in the peripheral blood of SLE patients

Cryopreserved PBMC of all 41 Mexican Mestizos patients with SLE and 45 age- and ethnicity-matched independent healthy subjects were analyzed by flow cytometry to determine the frequencies of naive, memory and plasma B cells. Consistent with previous works [1,41], several abnormalities of the B-cell compartment were detected in the peripheral blood of SLE patients including a B-cell lymphopenia

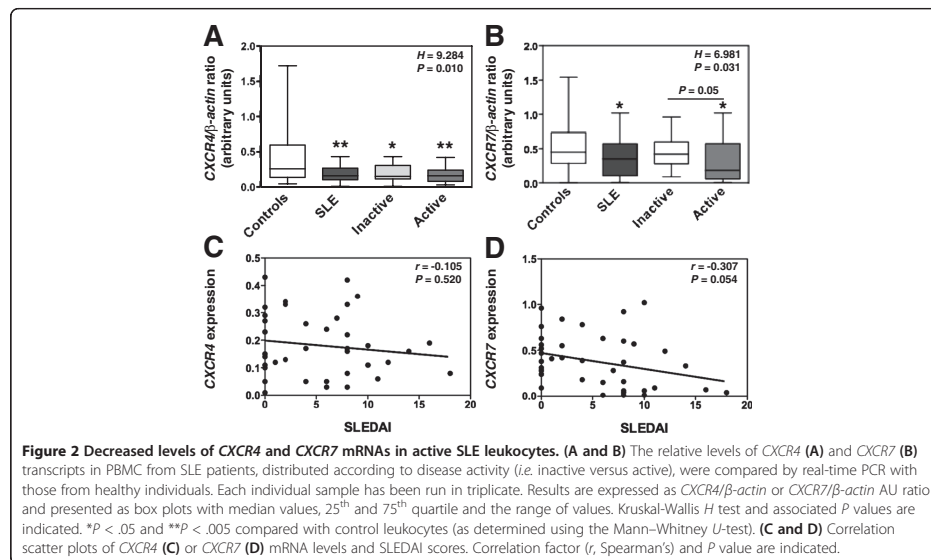
that predominantly affects naive B cells (Figure 1B and Table 1). In contrast, a significant increase in the frequency of PC was observed in patients with SLE (Figure 1A). Comparison of the proportions of the different B-cell subpopulations from SLE patients distributed according to disease activity, *i.e.* inactive ($n = 17$, SLEDAI ≤ 3) versus active ($n = 24$, SLEDAI > 3), revealed more marked B-cell alterations in the blood of patients with active SLE. No significant correlation could be detected between white blood cell count and disease activity, duration or organ alteration (*i.e.* renal, muco-cutaneous). In accordance with previous reports [6,32], only the frequency of PC positively and significantly correlated with the disease activity among peripheral B-cell subsets (Figure 1C). Taken together, our data confirmed perturbations of peripheral B-cell homeostasis, which were more pronounced in patients with active disease. The implication of CXCR4 and CXCR7 in the terminal differentiation of B cells into Ab-secreting cells [15,30] prompted us to investigate whether altered B-cell distribution in SLE was associated with changes in CXCL12 receptors expression.

Reduced levels of CXCR4 and CXCR7 mRNAs in SLE leukocytes

We have set up real-time PCR analysis to quantify relative levels of *CXCR4* and *CXCR7* mRNAs in SLE PBMC as compared with those detected in the 45 healthy individuals. Transcripts encoding CXCR4 were readily detectable in leukocytes from healthy subjects (Figure 2A). Likewise, *CXCR7* mRNAs could be amplified in control leukocytes (Figure 2B). Expression levels of both *CXCR4* and *CXCR7* mRNAs scattered over a large range among donors, likely as the consequence of an inter-individual variability [33,42,43]. However, the levels of *CXCR4* and *CXCR7* transcripts were significantly decreased in leukocytes from patients with active disease as compared to control cells (Figures 2A and B). Amounts of *CXCR4* and *CXCR7* mRNAs seemed to negatively correlate with SLEDAI scores, although this did not reach statistical significance (Figures 2C and D). Disease duration and muco-cutaneous manifestation did not impact on *CXCR4* or *CXCR7* expression. When comparing the group with renal failure history ($n=26$) with that of non-renal-affected patients ($n=15$), we did not find any significant differences between both groups regarding *CXCR4* or *CXCR7* expression. Thus, our results unveiled a decrease in *CXCR4* and *CXCR7* mRNA content in PBMC from SLE patients, which is more pronounced in those with active disease.

Defective membrane expression of CXCR4 and CXCR7 in SLE B lymphocytes

We next assessed whether such transcriptional anomaly could result in reduced protein levels on circulating B cells. A global flow-cytometric analysis of the expression of



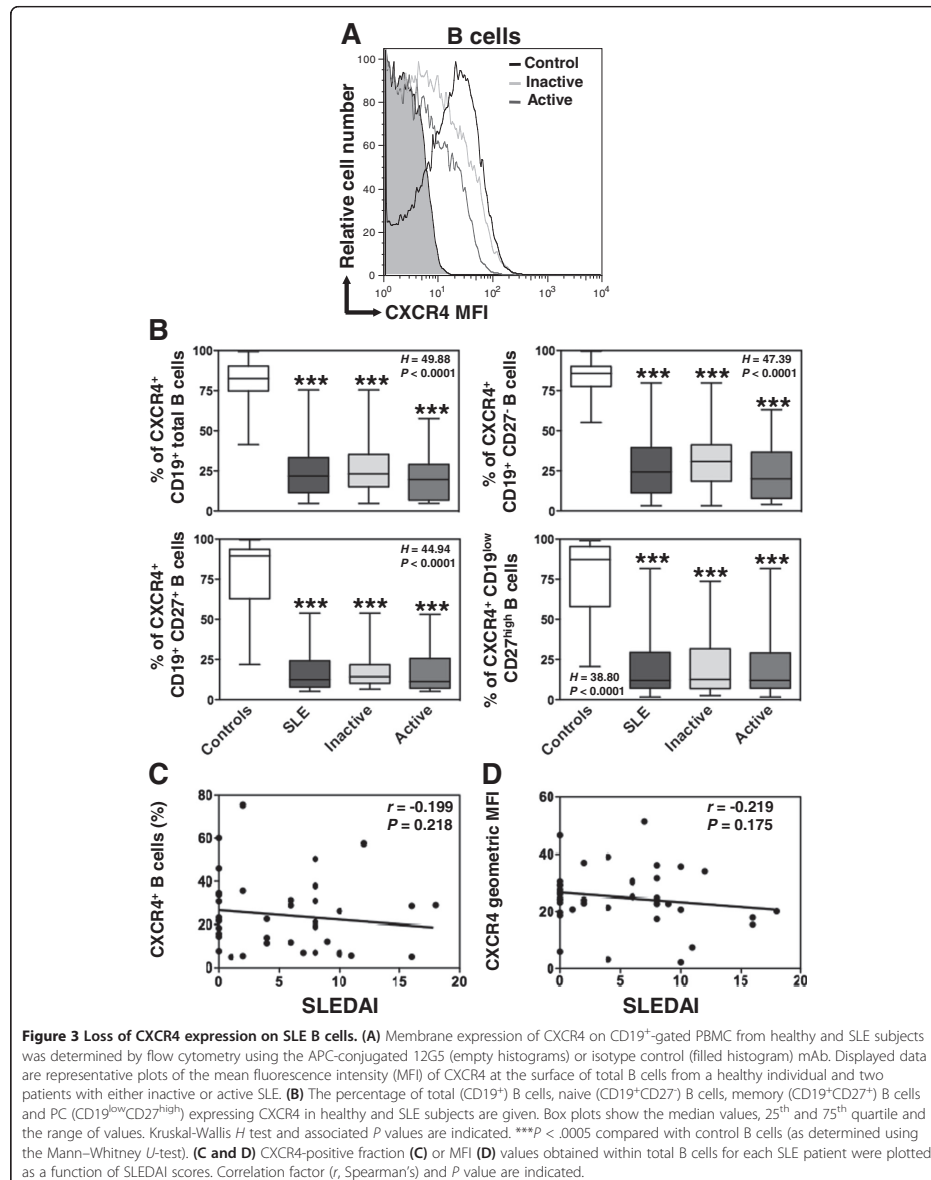
CXCR4 and *CXCR7* was performed on the three B-cell subpopulations, *i.e.* naive B cells, memory B cells and PC, in the control and SLE groups. As shown in Figure 3A, most peripheral blood B cells of healthy donors expressed *CXCR4* (median value 82%, range: 41 to 99%). The percentage of *CXCR4*-positive cells decreases as control B cells differentiate to PC (Figure 3B). In addition, *CXCR4* surface expression reached different levels on total B cells (geometric mean fluorescence intensity (MFI) median value 55, range: 11 to 217) and the different B-cell subsets as well (Additional file 1: Figure S1A). In line with previous works [41], *CXCR4* expression on circulating B cells was significantly lower in SLE patients than in healthy controls (Figures 3A and B and Additional file 1: Figure S1A). Because the decrease in *CXCR4* expression could be due to changes in the proportion of B-cell subsets or variations in expression levels within subsets, we performed an intra-subset analysis. Both frequencies of *CXCR4*-positive B cells and expression levels of *CXCR4* within naive, memory and PC subsets were markedly reduced in patients with SLE (Figure 3B and Additional file 1: Figure S1A). Strikingly, B cells from patients with either inactive or active disease displayed a comparable defect in cell surface *CXCR4* expression in the three subsets analyzed. Therefore, and similarly to the disease duration or organ manifestation (*i.e.* renal, muco-cutaneous), the disease activity did not impact on the level of *CXCR4* expression. Consequently, no

significant correlation could be detected between SLEDAI scores and *CXCR4* expression on total B cells (Figures 3C and D).

We concomitantly assessed *CXCR7* protein expression on B-cell subpopulations using the 9C4 mAb, which has been previously reported to specifically react with human *CXCR7* [29,30,33]. Confirming this, the 9C4 mAb stained *CXCR7*-transduced, but not parental, HEK cells (Figure 4A). Compared with *CXCR4*, we observed only low levels of *CXCR7* (median value 4.8%, range: 0.2 to 27%) at the surface of CD19⁺-gated PBMC from healthy individuals (Figure 4B). *CXCR7* remained scarcely expressed on maturing, including memory, B cells. Similar staining patterns were obtained using commercially available 11G8 and 8F11-M16 anti-*CXCR7* mAbs. *CXCR7* expression on naive and overall CD27⁺ B cells was still significantly lower in SLE patients than in healthy controls. However, as for *CXCR4*, there was no correlation between *CXCR7* expression levels and the clinical activity of SLE (Figure 4C).

When we compared patients with (n=25) or without (n=16) prednisolone-based treatment, no significant differences were found between both groups in term of receptors levels. As most active patients received 30 or 50 mg/day prednisolone, we thus cannot assigned an impact of steroids on *CXCR4* or *CXCR7* expression. Taken together, these findings unraveled a down-regulation of *CXCL12* receptors on circulating B-cell subsets from SLE patients. We next addressed whether this loss of

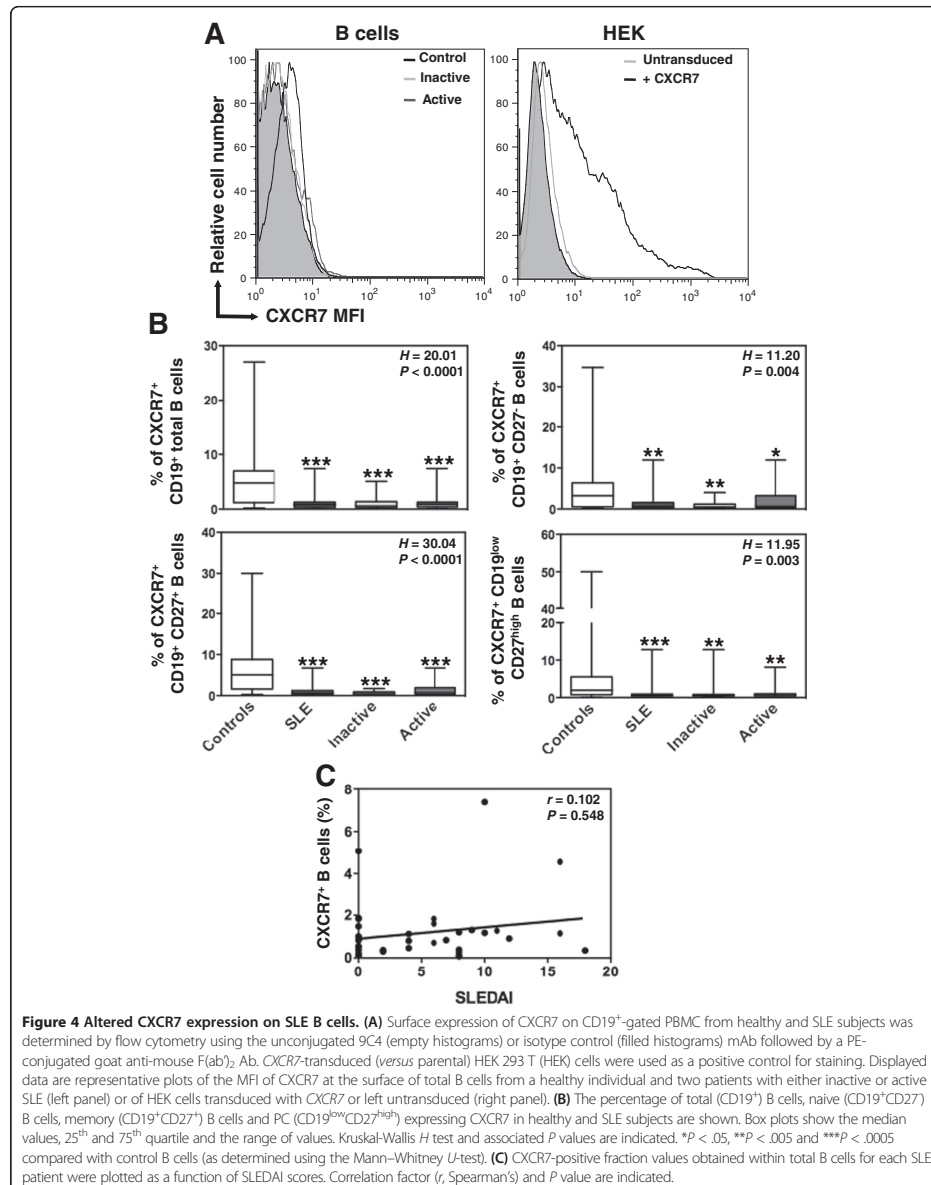
Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes



Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Biajoux et al. *Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:251
<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/251>

Page 9 of 16



membrane CXCR4 and CXCR7 expression was associated with an abnormal intracellular compartmentalization of the receptors.

Intracellular localization of CXCL12 receptors in SLE B lymphocytes

CXCR4 is mostly expressed at the surface of circulating leukocytes from healthy donors, while its intracellular pool is rather minor [44,45]. By contrast, CXCR7 is rarely, or even not, expressed at the membrane of human and mouse leukocytes [21,29,30,46]. Some studies indicated that CXCR7 is predominantly localized underneath the plasma membrane [47], while others failed to detect it intracellularly [31]. Stimulated by this puzzling picture of the intracellular detection of CXCR4 and CXCR7, we assessed by flow cytometry the expression of both receptors in CD19⁺-gated PBMC after permeabilization. This step allowed detecting relative total, *i.e.* both cell surface and intracellular, pools of CXCR4 and CXCR7 in B cells. As shown in Figure 5A, the majority of total B cells from healthy individuals coexpressed CXCR4 and CXCR7 (median value 97%, range: 51.9 to 99%). About 1% and 3% of B cells only expressed CXCR4 or CXCR7, respectively, whereas roughly < 1% of the cells expressed neither CXCR4 nor CXCR7. A similar pattern was found in the different B-cell subsets (Figure 5B). These findings, combined with those displayed in Figures 3 and 4, confirmed the differential cellular compartmentalization of both CXCR4 and CXCR7, *i.e.* predominant cell surface detection of CXCR4 (>80% total pool) and intracellular localization of CXCR7 (>90% total pool).

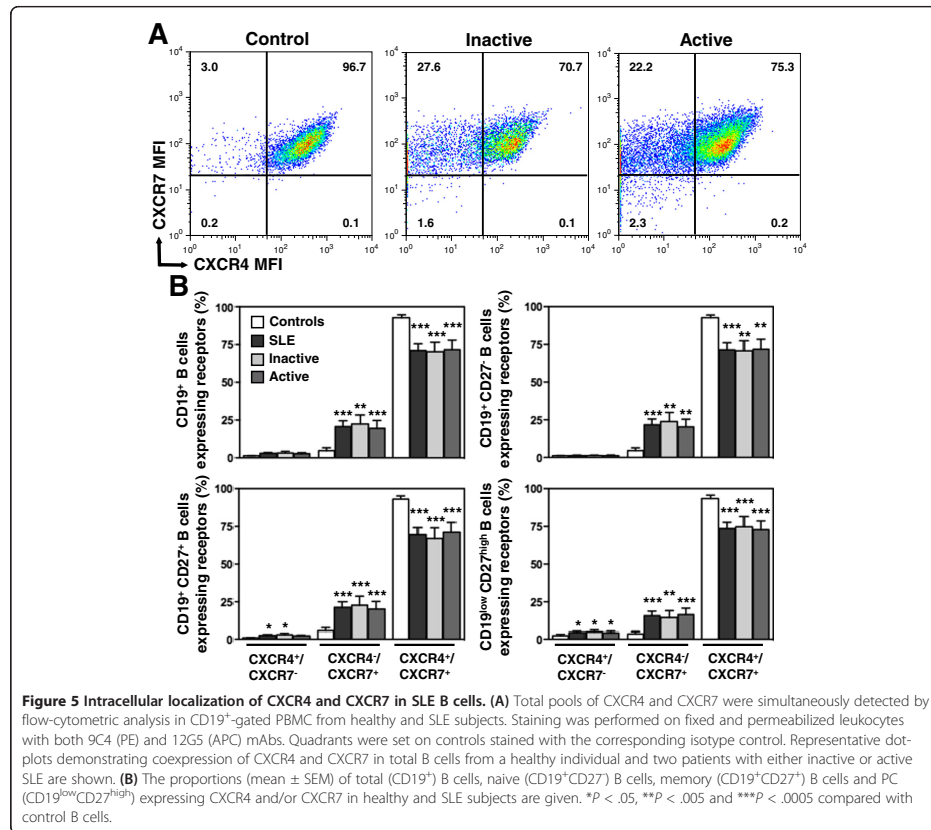
The situation was somewhat different in permeabilized PBMC from SLE patients. The fraction of total B cells coexpressing both receptors was slightly decreased by ~20-30% relative to control cells, while the proportion of B cells expressing only CXCR4 or CXCR7 was significantly increased (Figure 5). The defect in total CXCR4 expression was comparable among naive, memory and PC subsets from patients with either inactive or active disease. These data further revealed a significant intracellular detection of both CXCR4 (>60% total pool) and CXCR7 (>90% total pool) in SLE B cells. In line with this, geometric MFI values for total pools of CXCR4 and CXCR7 were roughly comparable in B cells from healthy and SLE subjects, while membrane expression levels of CXCR4 were decreased on SLE B cells (Additional file 1: Figure S1). Collectively, our findings established that naive and overall CD27⁺ B cells from both healthy and SLE individuals displayed a nearly exclusive expression of CXCR7 in cytosolic compartments. The loss of membrane CXCR4 expression in SLE B cells was accompanied by its abnormal intracellular localization.

Impaired CXCL12-promoted chemotaxis of SLE B lymphocytes

We thus questioned whether impaired compartmentalization of CXCL12 receptors, *i.e.* decreased at the membrane and increased at the intracellular level, in SLE B cells impacted on CXCL12 responsiveness. We investigated the migratory response of CD19⁺-gated PBMC from healthy and SLE subjects to CXCL12 using a Transwell-based chemotaxis assay. Addition of CXCL12 resulted in a dose-dependent chemotactic response of both control and SLE B cells (Figure 6A). However, SLE B cells displayed weaker migratory responses to all concentrations tested, indicating a lower efficiency of chemotaxis to CXCL12. In contrast, CCR7-dependent migration following CCL19 stimulation was observed to be in the same range for SLE and control B cells. We then compared chemotactic responses of the different B-cell subsets from patients with either inactive or active SLE to those obtained with control cells. The CXCL12 dose was chosen so that migration was detectable for B cells harboring low CXCL12 receptors expression (*i.e.* SLE group) without reaching saturating concentrations for B cells with higher receptor expression (*i.e.* control group). Upon exposure to 30 nM CXCL12, the percentage of specific migration of B cells from healthy donors was of ~15%, ~30% and ~40% in the naive, memory and PC subsets, respectively (Figure 6B). Remarkably, circulating B cells from patients with inactive or active disease shared an impaired CXCL12-promoted chemotaxis, with a significant reduction (> 60% as compared to control cells) of specific migration in the three subsets analyzed. Such decrease in migration efficiency was consistent with the severe decrease in CXCR4 expression observed on all SLE B-cell subsets. The residual migration of SLE B cells upon CXCL12 exposure was totally inhibited by the specific CXCR4 antagonist AMD3100 [48]. Overall, these findings suggested that the defect in membrane CXCR4 expression contributes to the loss of CXCL12 responsiveness of SLE B lymphocytes.

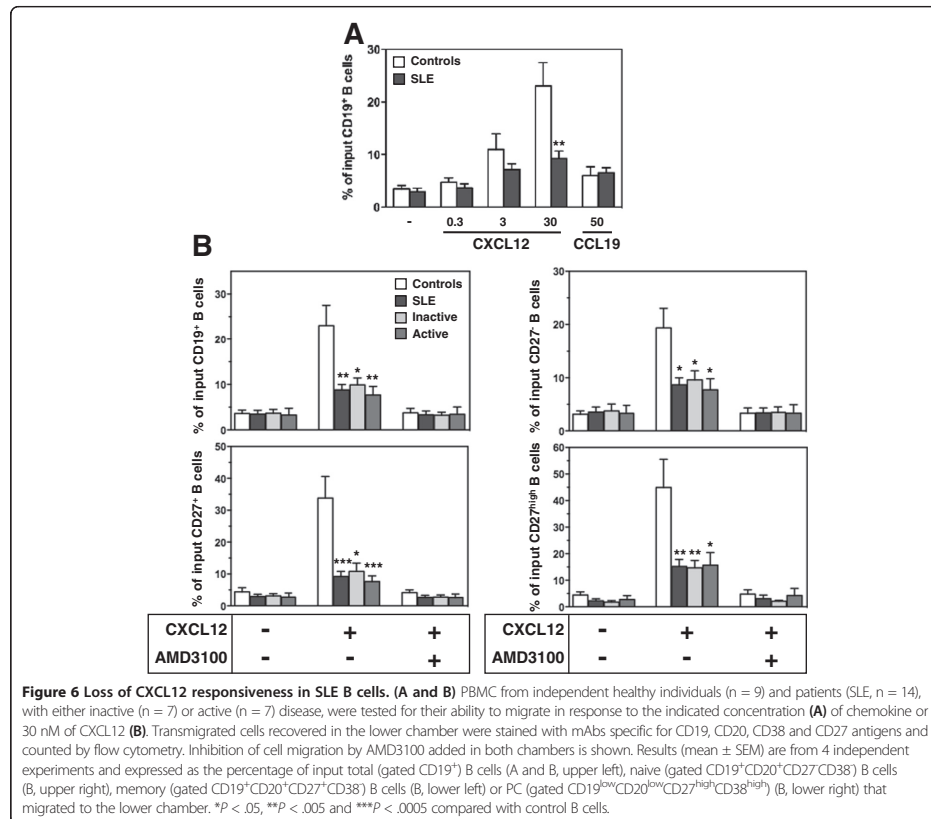
Discussion

In the present study, we provided novel insights to SLE pathophysiology based on the systematic evaluation of CXCL12 receptors expression in circulating B cells from a large cohort of 41 Mexican Mestizos patients. Our findings revealed reduced levels of CXCR4, and to a lesser extent of CXCR7, transcripts in SLE PBMC compared to controls. SLE was associated with a strong defect of membrane CXCR4 expression in naive and Ab-secreting B cells accompanied by an abnormal intracellular detection of CXCR4. CXCR7 was scarcely expressed on control and SLE B cells and predominantly localized in cytosolic compartments. Altered receptor compartmentalization was associated with an impaired CXCL12-promoted migration of SLE B cells. As the majority (n=23) of active patients were treated with at least



two drugs, we cannot assess the effects of each immunosuppressive therapy on CXCL12 receptors expression and function. Neither disease activity or duration nor muco-cutaneous and renal manifestations significantly influenced CXCR4 and CXCR7 protein expression. Conversely, when we applied a single cut-off at 21.79% and 0.83%, the respective median value for CXCR4- and CXCR7-positive B cells in the entire cohort, for the classification of patients displaying low or high levels of CXCL12 receptors expression, no clinical difference was found between the two groups ($P = 0.52$ and $P = 0.21$ for CXCR4 and CXCR7 respectively, Mann-Whitney U -test). Thus, it would be worthwhile to investigate groups of active patients with joint/cutaneous, hematological, CNS, and pure renal involvement in order to differentiate how these manifestations impact on receptors expression.

CXCR4 is involved in B-cell differentiation and homing as well as in the inflammatory development and progression of B-cell mediated autoimmune disorders including SLE [3,13]. In line with previous works [13,15,42], we observed that the vast majority of circulating total B cells from healthy donors stained for CXCR4, while the frequency of CXCR4-positive B cells decreased upon differentiation. Similarly, an inverse correlation of membrane CXCR4 expression and maturing stage of B cells was detected in SLE patients. However, the frequency of CXCR4-positive B cells within naive, memory and PC subsets was significantly decreased, suggesting that the defect in membrane CXCR4 expression results from an intrinsic CXCR4 anomaly rather than the expansion of a CXCR4-negative B-cell subpopulation. Circulating B cells from patients with either inactive or active disease displayed a comparable defect in



membrane CXCR4 expression, indicating that the disease activity did not impact on the level of CXCR4 expression. Thus, our findings provided evidence that SLE B cells display a loss of membrane CXCR4 expression. In agreement with this, Henneken and coworkers previously showed a decrease in CXCR4-positive naive and overall CD27⁺ B cells from 4 SLE patients [41]. Because CXCR4 is virtually expressed on all B-cell subsets, changes in CXCL12 responsiveness that occur throughout lymphocyte ontogeny were proposed to result from differences in the activation of CXCR4-mediated signaling [15]. For instance, CXCR4 expression is downregulated upon B-cell receptor engagement [49]. It is tempting to speculate that the loss of CXCR4 expression in SLE reflects, at least in part, chronic *in vivo* B-cell activation.

While there is a relative consensus on CXCR4 anomaly in B cells of several mouse models of lupus nephritis [13,50], the situation is still unclear in humans. Indeed, Wang and coworkers observed increased CXCR4 levels in circulating B and T cells from 31 SLE patients [16]. These findings have been partially confirmed by Rodriguez-Bayona and coworkers who detected in a larger cohort composed of 69 patients a slight increase in CXCR4 expression restricted to non-switched memory B cells and sparing other B-cell subsets [8]. The reasons for discrepancies on CXCR4 profiles between our work and principally that of Wang and coworkers are unclear but may relate to differences in sample handling or ethnical origin of patients [51]. Indeed, whereas Wang and coworkers performed CXCR4 staining on whole blood [16], we analyzed CXCL12 receptors patterns on PBMC, indicating that the Ficoll-

based isolation could constitute a cause for the differences on CXCR4 expression. However, and in contrast to the recent study by Nieto and coworkers [38], we found only discrete differences in CXCR4 expression at the surface of control B cells after cell isolation as compared to whole blood samples (Additional file 2: Figure S2). Cryopreservation of PBMC might also constitute a source of changes in labile phenotypic markers and B-cell subset distribution. Recently, Faint and coworkers showed that cryopreserved sample batching, and subsequent thawing for deferred analysis, did not alter the proportion of lymphocyte subsets but led to an increased CXCR4 expression on lymphocytes [52]. In our hands, the cryopreservation step indeed influenced positively CXCR4 expression on control B cells (Additional file 2: Figure S2). Thus, this process cannot solely explain the CXCR4 down-regulation we describe here. SLE represents a polygenic disease for which several clinical differences among ethnic groups have been documented [2,53,54]. Having focused on a cohort of 41 Mexican Mestizos patients [34], we differed from other studies, which have assessed CXCR4 expression on lymphocytes from patients with various ethnical origins [8,16]. Therefore, we cannot rule out that heterogeneity in the genetic background could account for contradictory results.

The molecular basis underlying the defect in CXCR4 expression on SLE B cells is unclear but might involve both impaired receptor synthesis and intracellular trafficking. We unveiled decreased *CXCR4* expression in PBMC from SLE patients. Such transcriptional anomaly, which is consistent with a recent study [18], could result in reduced protein levels in circulating leukocytes including the B-cell compartment. Whether epigenetic (e.g. promoter hypermethylation) or post-transcriptional (e.g. microRNA) regulatory mechanisms account for the decrease in the steady-state levels of *CXCR4* mRNAs will be the focus of future investigations on sorted B cells from patients. Our findings were enough indicative to delineate how such transcriptional anomaly could impact on protein levels, especially in circulating B cells. Flow-cytometric analysis revealed a significant decrease in the total pool of CXCR4 together with an impaired compartmentalization of the receptor, i.e. reduced at the cell surface and increased at the intracellular level, in all B-cell subsets from SLE patients irrespective of their disease activity status. The different cytokine milieu in SLE patients could alter the expression and activity of CXCR4. An increase in serum TNF- α and type I IFN levels is characteristic of SLE [11] and both cytokines are known to down-regulate CXCR4 [55,56]. The pro-inflammatory cytokine IL-17 might be involved in such phenomenon, as it increased in the serum of SLE patients [57] and down-modulated the responsiveness of germinal center B cells to CXCL12 in autoimmune BXD2

mice [58]. Interestingly, an increase of CXCL12 in the serum of SLE patients has been reported [59]. Since CXCR4 engagement upon CXCL12 stimulation paradigmatically leads to receptor internalization, one can speculate that chronic exposure to CXCL12 is another potential explanation for abnormal CXCR4 expression on autoreactive B cells.

The study was extended to the expression of CXCR7, which is another receptor for CXCL12 but, unlike CXCR4, it has never been investigated in the context of lupus pathogenesis. Surface expression of CXCR7 is well documented on activated endothelium, fetal liver cells, neurons and multiple cancer cells [19,60]. Many groups have detected CXCR7 products in mouse and human leukocytes, although one study challenged this view [31,33]. Our real-time PCR-based analysis permitted to readily detect mRNAs encoding CXCR7 in PBMC from healthy subjects, further corroborating previous studies demonstrating unambiguously transcript amplification in mouse and human monocytes, dendritic cells, CD4⁺ T cells, neutrophils and B cells [19,30,33,61,62]. Nevertheless, SLE leukocytes displayed a slight decrease in the steady-state level of *CXCR7* transcripts. Further in-depth studies are required to determine whether transcriptional regulatory mechanisms account for heterogeneous *CXCR7* expression in SLE. Like for CXCR4, we found no differences in *CXCR7* expression at the surface of control B cells after Ficoll-based cell isolation as compared to whole blood samples (Additional file 3: Figure S3). In contrast, the cryopreservation step led to a reduced *CXCR7* expression on B cells. Thus, we cannot exclude that cryopreserved sample batching contributes to low levels of *CXCR7* on SLE B cells.

Intracellular compartmentalization of CXCL12 receptors was simultaneously assessed by flow cytometry after cell permeabilization, and in line with previous works [20,47], unraveled that CXCR7 predominantly localized in cytosolic compartments of B-cell subsets from healthy and SLE subjects. Such peculiar intracellular pattern is consistent with the notion that CXCR7 rapidly cycles between the plasma membrane and intracellular compartments either spontaneously or upon exposure to its ligand [20,24,28,47]. The main function of endothelium-expressed CXCR7 is likely sequestration of CXCL12 as proposed in homeostatic and pathological, including autoimmune, conditions [24,46]. Additionally, mouse CXCR7 seems to function as a sink for CXCL12 and contributes to marginal zone B-cell retention as well as kidney development [22,63]. Recently, we identified CXCR7 as an active scavenger for CXCL12 on human tonsil-derived B cells [33]. Although the relevance of this activity in human B-cell homeostasis remains to be determined, one can speculate that CXCR7 acts as a decoy receptor in B cells, thereby clearing CXCL12 from the surrounding medium

and controlling CXCR4 expression and/or signaling. A crosstalk between intracellular CXCR4 and CXCR7 could also be involved in the modulation of CXCL12 activities as previously proposed [47]. Finally, we cannot exclude that defective CXCR4 and CXCR7 expression in SLE leukocytes impacts on the anterograde trafficking, *i.e.* from synthesis in the endoplasmic reticulum to the plasma membrane, of both receptors, resulting in their altered cellular distribution [64]. Studying the relevance of CXCR7 in B-cell biology was not in the scope of this study but clearly deserves further investigations using selective antagonists for CXCR4 and CXCR7.

Conclusions

Our findings highlight a previously unappreciated down-regulation of CXCR4 and CXCR7 on circulating B cells from SLE patients. Such anomaly is associated with intracellular localization of both receptors and a loss of CXCL12 responsiveness. This is the first study assessing simultaneously the status of CXCL12 receptors in autoimmune-biased B cells. This work offers important pathophysiological insights into the migratory behavior of autoreactive B cells from SLE patients, potentially permitting new therapeutic avenues.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Distribution of CXCR4 and CXCR7 in SLE B cells. **(A)** Expression of CXCR4 on CD19⁺-gated PBMC from SLE patients (n = 41), distributed according to disease activity, *i.e.* inactive (n = 17) versus active (n = 24), and healthy individuals (n = 45) was determined by flow-cytometric analysis (FACS-Calibur, BD Biosciences) using the APC-conjugated 12G5 mAb. The geometric mean fluorescence intensity (MFI) of CXCR4 at the surface of total (CD19⁺) B cells, naive (CD19⁺CD27⁻) B cells, memory (CD19⁺CD27⁺) B cells and PC (CD19^{low}CD27^{high}) from healthy and SLE subjects are displayed. **(B)** Total pools of CXCR4 and CXCR7 were detected by flow cytometry by staining fixed and permeabilized leukocytes with 9C4 (PE) and 12G5 (APC) mAbs. The geometric MFI of CXCR4 or CXCR7 was evaluated in total B cells. Box plots show the median values, 25th and 75th quartile and the range of values. Kruskal-Wallis H test and associated P values are indicated. ***P < .0005 compared with control B cells. ^bP < .05 compared with B cells from patients with inactive SLE (as determined using the Mann-Whitney U-test).

Additional file 2: Figure S2. Sample processing modulates membrane CXCR4 expression. **(A)** Membrane expression of CXCR4 on control CD19⁺-gated B cells was determined by flow-cytometric (FACS Fortessa, BD Biosciences) analysis using the PE-conjugated 12G5 (empty histograms) or isotype control (filled histogram) mAb. Displayed data are representative plots of the MFI of CXCR4 at the surface of total B cells from 4 independent healthy Caucasian women (age median 35 years, range: 24 to 47 years) obtained either after staining on whole blood (Blood) or fresh (Ficoll) or cryopreserved (Cryo) PBMC. **(B)** The percentage of total (CD19⁺) B cells, naive (CD19⁺CD27⁻) B cells, memory (CD19⁺CD27⁺) B cells and plasma cells (CD19^{low}CD27^{high}) expressing CXCR4 are given. Box plots show the median values, 25th and 75th quartile and the range of values. **(C)** The geometric MFI of CXCR4 was evaluated for all aforementioned B-cell subsets. *P < .05, **P < .005 and ***P < .0005 compared with whole blood-gated B cells.

Additional file 3: Figure S3. Sample processing modulates membrane CXCR7 expression. **(A)** Surface expression of CXCR7 on CD19⁺-gated B cells from 4 independent healthy Caucasian women was determined by flow cytometry using the unconjugated 9C4 (empty histograms) or

isotype control (filled histograms) mAb followed by a PE-conjugated goat anti-mouse F(ab)₂. **(B)** The percentage of total (CD19⁺) B cells, naive (CD19⁺CD27⁻) B cells, memory (CD19⁺CD27⁺) B cells and plasma cells (CD19^{low}CD27^{high}) expressing CXCR7 are given. Box plots show the median values, 25th and 75th quartile and the range of values. **(C)** The geometric MFI of CXCR7 was evaluated for all B-cell subsets. *P < .05 and **P < .005 compared with whole blood-gated B cells.

Abbreviations

Ab: Antibody; APC: Allophycocyanin; BSA: Bovine serum albumin; CNS: Central nervous system; FCS: Fetal calf serum; FITC: Fluorescein isothiocyanate; MFI: Mean fluorescence intensity; NP: Neuropsychiatric; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PC: Plasma cells; PE: Phycoerythrin; PerCp-Cy5: Peridinin chlorophyll protein-Cy5; SDF-1: Stromal cell Derived Factor-1; SLE: Systemic Lupus Erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: VB, AB, DE and KB. Performed the experiments: VB, AB, CF and KB. Analyzed the data: VB, AB, CF and KB. Wrote the paper: VB, AB and KB. Provided funding: DE and KB. Provided experimental tools and contributed to manuscript editing: VM, MT and LL. Provided patient samples and clinical features: GL, JJ-O and LL. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank V. Godié (Université Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie", INSERM UMR_S996, Clamart, France) for excellent technical assistance, H. Tharinger (Plateforme d'Immunomonitorage, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Clamart) for editing the manuscript, and Dr. F. Balexuc (Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris, France) for providing us with CXCL12. We are grateful to Drs. V. Machelon and F. Bachelierie (INSERM UMR_S996) for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP, grant number 07018) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR, grant number 2010 JJCJ 1104 01). V.B., A.B., C.F., V.M., D.E. and K.B. are members of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (Investissements d'Avenir). V.B., A.B. and C.F. are fellowship recipients from the Fondation pour la Recherche Médicale, the French Ministry and the DIM Biothérapies, respectively. M.T. was supported by funds obtained from the Gottfried und Julia Bangerter-Rhyner-Stiftung, Basel, the Helmut Horten Foundation and the Fondazione Ticinese per la Ricerca sul Cancro.

Author details

¹Université Paris-Sud, Laboratoire "Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie", UMR_S996, Clamart, France. ²INSERM, Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Clamart, France. ³Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique, AP-HP, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France. ⁴Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland. ⁵Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico. ⁶Service de Microbiologie-Immunologie Biologique, AP-HP, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France.

Received: 18 September 2012 Accepted: 14 December 2012

Published: 18 December 2012

References

1. Rahman A, Isenberg DA: Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008, **358**:929-939.
2. Deng Y, Tsao BP: Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 2010, **6**:683-692.
3. Mitchison NA, Wedderburn LR: B cells in autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:8750-8751.

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Biajoux *et al. Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:251
<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/251>

Page 15 of 16

4. Nashi E, Wang Y, Diamond B: **The role of B cells in lupus pathogenesis.** *Int J Biochem Cell Biol* 2010, **42**:543–550.
5. Deshmukh US, Bagavant H, Fu SM: **Role of anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis.** *Autoimmun Rev* 2006, **5**:414–418.
6. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, Dorner T: **Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:1332–1342.
7. Pisetsky DS, Grammer AC, Ning TC, Lipsky PE: **Are autoantibodies the targets of B-cell-directed therapy?** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**:551–556.
8. Rodriguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Perez-Venegas JJ, Rodriguez C, Brieua JA: **Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD Igm B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R108.
9. Daridon C, Blassfeld D, Reiter K, Mei HE, Giesecke C, Goldenberg DM, Hansen A, Hostmann A, Frolich D, Dorner T: **Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R204.
10. Thelen M, Stein JV: **How chemokines invite leukocytes to dance.** *Nat Immunol* 2008, **9**:953–959.
11. Ohl K, Tenbrock K: **Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus.** *J Biomed Biotechnol* 2011, **2011**:432595.
12. Ezzat M, El-Gammasy T, Shaheen K, Shokr E: **Elevated production of serum B-cell-attracting chemokine-1 (BCA-1/CXCL13) is correlated with childhood-onset lupus disease activity, severity, and renal involvement.** *Lupus* 2011, **20**:845–854.
13. Chong BF, Mohan C: **Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in systemic lupus erythematosus.** *Expert Opin Ther Targets* 2009, **13**:1147–1153.
14. Ansel KM, Cyster JG: **Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development.** *Curr Opin Immunol* 2001, **13**:172–179.
15. Palmesino E, Moepps B, Gierschik P, Thelen M: **Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells.** *Immunobiology* 2006, **211**:377–389.
16. Wang A, Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, Zhou XJ, Lin F, Fairhurst AM, Boudreaux C, *et al*: **Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:3436–3446.
17. Balabanian K, Couderc J, Bouchet-Delbos L, Amara A, Berrebi D, Foussat A, Baleux F, Portier A, Durand-Gasselini I, Coffman RL, *et al*: **Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus.** *J Immunol* 2003, **170**:3392–3400.
18. Lugar PL, Love C, Grammer AC, Dave SS, Lipsky PE: **Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus.** *PLoS One* 2012, **7**:e44362.
19. Thelen M, Thelen S: **CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?** *J Neuroimmunol* 2008, **198**:9–13.
20. Ulvmar MH, Hub E, Rot A: **Atypical chemokine receptors.** *Exp Cell Res* 2011, **317**:556–568.
21. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zenwes HG, Rot A, Thelen M: **CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11.** *PLoS One* 2010, **5**:e9175.
22. Wang H, Beatty N, Chen S, Qi CF, Masiuk M, Shin DM, Morse HC 3rd: **The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12.** *Blood* 2011, **119**:465–468.
23. Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD: **Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands.** *Oncogene* 2010, **29**:4599–4610.
24. Hoffmann F, Muller W, Schutz D, Schulz S, Stumm R: **The CXCR7 C-terminal domain mediates efficient CXCL12 uptake and degradation.** *J Biol Chem* 2012, **287**:28362–28377.
25. Rajaogopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ: **Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:628–632.
26. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelierie F, Lagane B: **CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling.** *Blood* 2009, **113**:6085–6093.
27. Decaillet FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P: **CXCR7/CXCR4 Heterodimer Constitutively Recruits (beta)-Arrestin to Enhance Cell Migration.** *J Biol Chem* 2011, **286**:32188–32197.
28. Canals M, Scholten DJ, de Munnik S, Han MK, Smit MJ, Leurs R: **Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking.** *PLoS One* 2012, **7**:e34192.
29. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelierie F: **The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes.** *J Biol Chem* 2005, **280**:35760–35766.
30. Infantino S, Moepps B, Thelen M: **Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells.** *J Immunol* 2006, **176**:2197–2207.
31. Barahovich RD, Zabel BA, Penfold ME, Leven S, Wang Y, Miao Z, Gan L, Pereda J, Dias J, Slukvin II, *et al*: **CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes.** *J Immunol* 2010, **185**:5130–5139.
32. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, Hansen A, Burmester GR, Diamond B, Lipsky PE, Dorner T: **Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:1762–1773.
33. Humpert ML, Tzouros M, Thelen S, Bignon A, Levoye A, Arenzana-Seisdedos F, Balabanian K, Bachelierie F, Langen H, Thelen M: **Complementary methods provide evidence for the expression of CXCR7 on human B cells.** *Proteomics* 2012, **12**:1938–1948.
34. Juarez-Cedillo T, Zuniga J, Acuna-Alonzo V, Perez-Hernandez N, Rodriguez-Perez JM, Barquera R, Gallardo GJ, Sanchez-Arenas R, Garcia-Pena Mdel C, Granados J, Vargas-Alarcon G: **Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers.** *Forensic Sci Int Genet* 2008, **2**:e37–e39.
35. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1982, **25**:1271–1277.
36. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH: **Derivation of the SLEDAI, a disease activity index for lupus patients: the committee on prognosis studies in SLE.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**:630–640.
37. Yee CS, Farewell VT, Isenberg DA, Griffiths B, Teh LS, Bruce IN, Ahmad Y, Rahman A, Prabhu A, Akil M, *et al*: **The use of systemic lupus erythematosus disease activity index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients.** *Rheumatology (Oxford)* 2011, **50**:982–988.
38. Nieto JC, Canto E, Zamora C, Ortiz MA, Juarez C, Vidal S: **Selective loss of chemokine receptor expression on leukocytes after cell isolation.** *PLoS One* 2012, **7**:e31297.
39. Balabanian K, Levoye A, Klemm L, Lagane B, Hermine O, Harriague J, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Bachelierie F: **Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GSK3 in CXCR4 signaling.** *J Clin Invest* 2008, **118**:1074–1084.
40. Cikos S, Bukovska A, Koppel J: **Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis.** *BMC Mol Biol* 2007, **8**:113.
41. Henneken M, Dorner T, Burmester GR, Berek C: **Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**:R1001–R1013.
42. Payne D, Drinkwater S, Baretto R, Duddridge M, Browning MJ: **Expression of chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 on B and T lymphocytes from patients with primary antibody deficiency.** *Clin Exp Immunol* 2009, **156**:254–262.
43. Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Nakayama T, Shigeta A, Hieshima K, Yamada Y, Yoshie O: **CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells.** *Int J Cancer* 2009, **125**:2229–2235.
44. Kumar A, Kremer KN, Dominguez D, Tadi M, Hedin KE: **Galpha13 and Rho mediate endosomal trafficking of CXCR4 into Rab11+ vesicles upon stromal cell-derived factor-1 stimulation.** *J Immunol* 2011, **186**:951–958.
45. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, Lebbe C, Kerob D, Dupuy A, Hermine O, *et al*: **WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12.** *Blood* 2005, **105**:2449–2457.
46. Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, *et al*: **CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling albulmin CXCL12 abundance during autoimmunity.** *J Exp Med* 2011, **208**:327–339.
47. Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolosky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R: **A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation**

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Biajoux *et al. Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:251
<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/251>

Page 16 of 16

- but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* 2008, **84**:1130–1140.
48. Rettig MP, Ramirez P, Nervi B, DiPersio JF: **CXCR4 and mobilization of hematopoietic precursors.** *Methods Enzymol* 2009, **460**:57–90.
 49. Bleul CC, Schultze JL, Springer TA: **B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement.** *J Exp Med* 1998, **187**:753–762.
 50. Wang A, Fairhurst AM, Tus K, Subramanian S, Liu Y, Lin F, Igarashi P, Zhou XJ, Batteux F, Wong D, *et al*: **CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus.** *J Immunol* 2009, **182**:4448–4458.
 51. Maecker HT, McCoy JP Jr, Amos M, Elliott J, Gaigalas A, Wang L, Aranda R, Banchereau J, Boshoff C, Braun J, *et al*: **A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials.** *Nat Immunol* 2010, **11**:975–978.
 52. Faint JM, Tuncer C, Garg A, Adams DH, Lalor PF: **Functional consequences of human lymphocyte cryopreservation: implications for subsequent interactions of cells with endothelium.** *J Immunother* 2011, **34**:588–596.
 53. Costenbader KH, Desai A, Alarcon GS, Hiraki LT, Shaykevich T, Brookhart MA, Massarotti E, Lu B, Solomon DH, Winkelmayr WC: **Trends in the incidence, demographics, and outcomes of end-stage renal disease due to lupus nephritis in the US from 1995 to 2006.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**:1681–1688.
 54. Uribe AG, Romero-Diaz J, Apte M, Fernandez M, Burgos PI, Reveille JD, Sanchez-Guerrero J, Alarcon GS: **Impact of immigration on the clinical expression of systemic lupus erythematosus: a comparative study of Hispanic patients residing in the USA and Mexico.** *Rheumatology (Oxford)* 2009, **48**:1392–1397.
 55. Annunziato F, Cosmi L, Galli G, Beltrame C, Romagnani P, Manetti R, Romagnani S, Maggi E: **Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo.** *J Leukoc Biol* 1999, **65**:691–699.
 56. Postal M, Appenzeller S: **The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *Cytokine* 2011, **56**:537–543.
 57. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochot P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, *et al*: **Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus.** *Nat Immunol* 2009, **10**:778–785.
 58. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, Yi J, Guentert T, Tousson A, Stanus AL, *et al*: **Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice.** *Nat Immunol* 2008, **9**:166–175.
 59. Robak E, Kulczycka L, Sysa-Jedrzejowska A, Wierzbowska A, Robak T: **Circulating proangiogenic molecules PlGF, SDF-1 and sVCAM-1 in patients with systemic lupus erythematosus.** *Eur Cytokine Netw* 2007, **18**:181–187.
 60. Sanchez-Alcaniz JA, Haege S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, Lopez-Bendito G, Stumm R, Marin O: **Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness.** *Neuron* 2011, **69**:77–90.
 61. Winkelmann R, Sandrock L, Porstner M, Roth E, Mathews M, Hobeika E, Reth M, Kahn ML, Schuh W, Jack HM: **B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Kruppel-like factor 2.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**:710–715.
 62. Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, *et al*: **Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:14759–14764.
 63. Haege S, Einer C, Thiele S, Mueller W, Nietzsche S, Lupp A, Mackay F, Schulz S, Stumm R: **CXC Chemokine receptor 7 (CXCR7) regulates CXCR4 protein expression and capillary tuft development in mouse kidney.** *PLoS One* 2012, **7**:e42814.
 64. Odemis V, Boosmann K, Heinen A, Kury P, Engle J: **CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells.** *J Cell Sci* 2010, **123**:1081–1088.

doi:10.1186/1479-5876-10-251

Cite this article as: Biajoux *et al*: Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Translational Medicine* 2012 **10**:251.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supplemental Figure 1: Distribution of CXCR4 and CXCR7 in SLE B cells. (A)

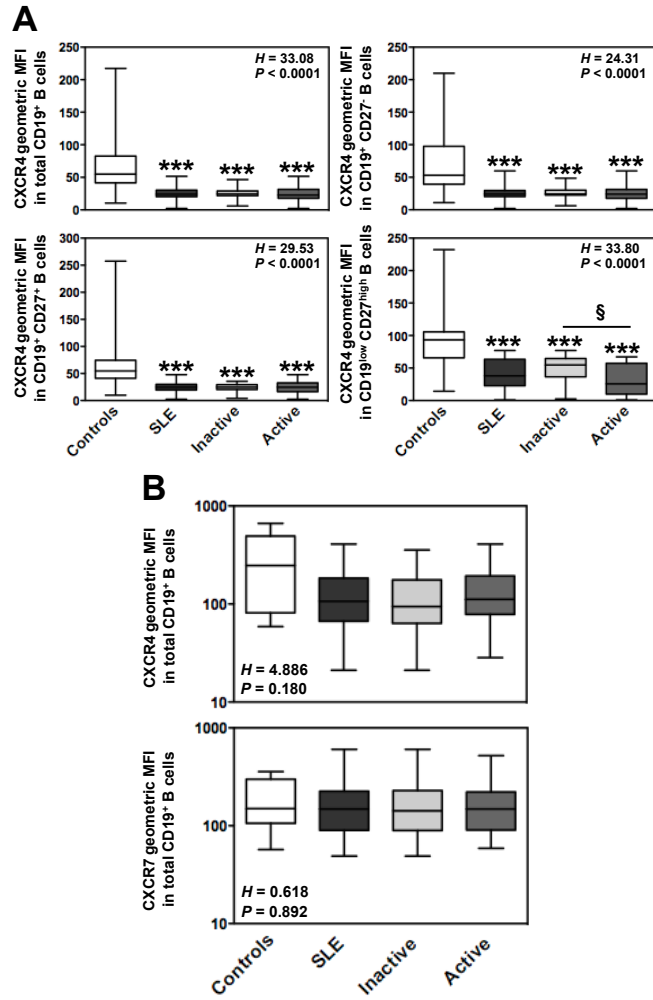
Expression of CXCR4 on CD19⁺-gated PBMC from SLE patients (n = 41), distributed according to disease activity, *i.e.* inactive (n = 17) versus active (n = 24), and healthy individuals (n = 45) was determined by flow-cytometric analysis (FACSCalibur, BD Biosciences) using the APC-conjugated 12G5 mAb. The geometric mean fluorescence intensity (MFI) of CXCR4 at the surface of total (CD19⁺) B cells, naive (CD19⁺CD27⁻) B cells, memory (CD19⁺CD27⁺) B cells and PC (CD19^{low}CD27^{high}) from healthy and SLE subjects are displayed. **(B)** Total pools of CXCR4 and CXCR7 were detected by flow cytometry by staining fixed and permeabilized leukocytes with 9C4 (PE) and 12G5 (APC) mAbs. The geometric MFI of CXCR4 or CXCR7 was evaluated in total B cells. Box plots show the median values, 25th and 75th quartile and the range of values. Kruskal-Wallis *H* test and associated *P* values are indicated. ****P* < .0005 compared with control B cells. §*P* < .05 compared with B cells from patients with inactive SLE (as determined using the Mann-Whitney *U*-test).

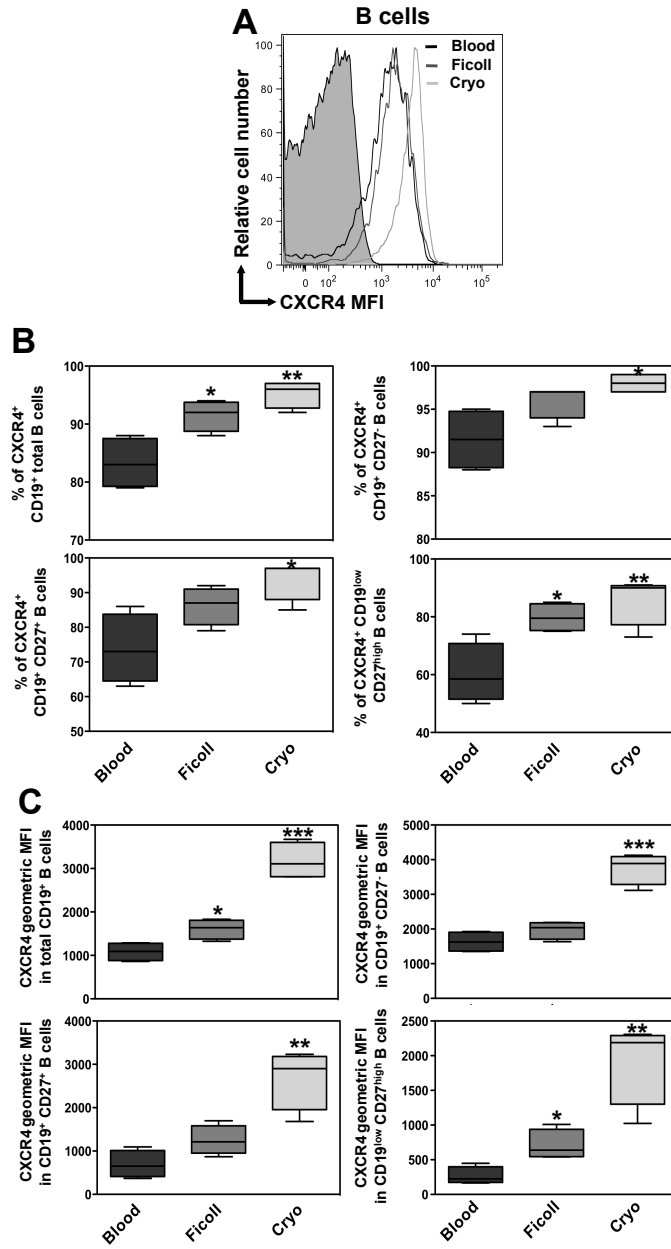
Supplemental Figure 2: Sample processing modulates membrane CXCR4

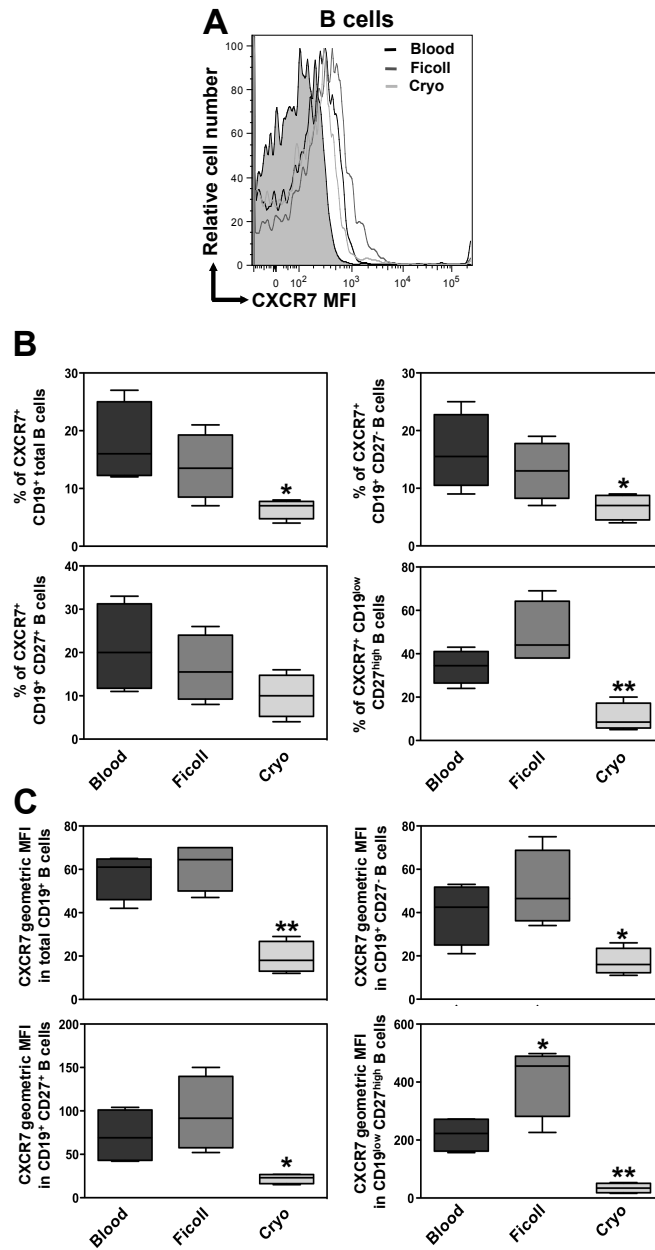
expression. (A) Membrane expression of CXCR4 on control CD19⁺-gated B cells was determined by flow-cytometric (FACS Fortessa, BD Biosciences) analysis using the PE-conjugated 12G5 (empty histograms) or isotype control (filled histogram) mAb. Displayed data are representative plots of the MFI of CXCR4 at the surface of total B cells from 4 independent healthy Caucasian women (age median 35 years, range: 24 to 47 years) obtained either after staining on whole blood (Blood) or fresh (Ficoll) or cryopreserved (Cryo) PBMC. **(B)** The percentage of total (CD19⁺) B cells, naive (CD19⁺

CD27⁻) B cells, memory (CD19⁺ CD27⁺) B cells and plasma cells (CD19^{low} CD27^{high}) expressing CXCR4 are given. Box plots show the median values, 25th and 75th quartile and the range of values. (C) The geometric MFI of CXCR4 was evaluated for all aforementioned B-cell subsets. **P* < .05, ***P* < .005 and ****P* < .0005 compared with whole blood-gated B cells.

Supplemental Figure 3: Sample processing modulates membrane CXCR7 expression. (A) Surface expression of CXCR7 on CD19⁺-gated B cells from 4 independent healthy Caucasian women was determined by flow cytometry using the unconjugated 9C4 (empty histograms) or isotype control (filled histograms) mAb followed by a PE-conjugated goat anti-mouse F(ab')₂ Ab. Displayed data are representative plots of the MFI of CXCR7 at the surface of total B cells obtained either after staining on whole blood (Blood) or fresh (Ficoll) or cryopreserved (Cryo) PBMC. (B) The percentage of total (CD19⁺) B cells, naive (CD19⁺ CD27⁻) B cells, memory (CD19⁺ CD27⁺) B cells and plasma cells (CD19^{low} CD27^{high}) expressing CXCR7 are given. Box plots show the median values, 25th and 75th quartile and the range of values. (C) The geometric MFI of CXCR7 was evaluated for all B-cell subsets. **P* < .05 and ***P* < .005 compared with whole blood-gated B cells.









médecine/sciences 2011 ; 27 : 261-8

► Actuellement, plus de 200 déficits immunitaires primaires ont été identifiés. Leurs défauts génétiques affectent majoritairement l'expression ou la fonction de protéines impliquées dans le développement et la maturation du système hématopoïétique. Certaines maladies immuno-hématologiques « orphelines » sont caractérisées par un désordre de la migration leucocytaire, évocateur d'une anomalie des chimiokines et de leurs récepteurs. Cette revue dresse l'état actuel des connaissances sur les anomalies de l'axe de signalisation CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 récemment identifiées dans la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique et le syndrome WHIM (*warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome*), deux déficits immunitaires rares chez l'homme et associés respectivement à une perte et un gain de fonction de CXCR4. ◀

In memoriam

Les auteurs dédient cette revue à la mémoire de notre collègue et directeur d'unité, le Professeur Dominique Émilie, disparu tragiquement le 25 février 2011 et que nous regrettons vivement.

Les chimiokines (CK) sont de petites cytokines sécrétées et dotées d'un pouvoir chimiotactique qui gouvernent le trafic des leucocytes et le recrutement de cellules effectrices au site de l'agression. Ces activités sont relayées par des récepteurs (RCK) qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G, lesquels constituent les cibles de près de la moitié des médicaments disponibles [1]. Les CK/RCK exercent de multiples fonctions au sein de l'organisme, dépassant le cadre des seuls phénomènes migratoires en physio(patho)logie. Un enjeu majeur consiste à déterminer l'implication d'un, ou plusieurs, couple(s) de CK/RCK dans une pathologie d'intérêt, d'en comprendre le mode de fonctionnement et de générer des antagonistes spécifiques. Dans cette

CXCR4, une cible thérapeutique dans certains déficits immunitaires rares ?

Alexandre Bignon, Vincent Bijaoux,
Laurence Bouchet-Delbos, Dominique Émilie,
Olivier Lortholary, Karl Balabanian

A. Bignon, V. Bijaoux, L. Bouchet-Delbos, K. Balabanian : Université Paris-Sud, laboratoire Cytokines, chimiokines et immunopathologie, UMR-S996, 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France ; Inserm, 92140 Clamart, France. D. Émilie : Université Paris-Sud, laboratoire Cytokines, chimiokines et immunopathologie, UMR-S996, 32, rue des Carnets, 92140 Clamart, France ; Inserm, 92140 Clamart ; AP-HP, 92140 Clamart, France. O. Lortholary : Université Paris Descartes, service des maladies infectieuses et tropicales, Hôpital Necker-Enfants malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris, France ; AP-HP, 75743 Paris, France. karl.balabanian@u-psud.fr

optique, la CK α CXC *stromal cell derived factor-1* (SDF-1/CXCL12) et ses récepteurs constituent des cibles privilégiées pour l'élaboration de nouvelles approches pharmacologiques à visée thérapeutique¹.

CXCL12, une chimiokine singulière

CXCL12 est constitutivement exprimée par les cellules stromales, épithéliales et endothéliales, notamment dans les organes lymphoïdes (OL), et constitue l'unique ligand naturel de CXCR4, un RCK ubiquitaire initialement identifié comme un corécepteur du virus de l'immuno-déficience humaine (VIH). CXCL12 est un facteur chimiotactique pour différentes populations leucocytaires, dont les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B et les polynucléaires neutrophiles [2]. L'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle-clé dans des processus homéostatiques comme l'organogenèse, l'hématopoïèse et le trafic leucocytaire. Des dérè-

¹ Les chimiokines sont classées en quatre groupes selon le nombre d'acides aminés présents entre les deux premières cystéines situées dans la partie amino-terminale : CC, CX, CX3C ainsi que le groupe C qui comprend la lymphotactine (XCL1). Le groupe CX3C est encore subdivisé en deux catégories en fonction de la présence ou de l'absence d'un motif ELR (glutamate-leucine-arginine) en amont du premier résidu cystéine. Cette classification structurale fait aujourd'hui office de nomenclature de référence mais les noms communs donnés précédemment aux chimiokines sont encore largement utilisés, comme par exemple SDF-1 (CXCL12), SLC (CXCL11), ELC (CXCL19), MIP-3 α (CXCL20), etc.

REVUES



SYNTHÈSE



gulations des voies de signalisation ou de l'expression de CXCR4 ont été décrites dans certaines pathologies auto-immunes (exemple : le lupus), neurodégénératives (exemple : la sclérose en plaques), cardiovasculaires (exemple : l'insuffisance coronarienne) et tumorales (exemple : le carcinome mammaire) [3]. Jusqu'en 2005, CXCL12 et CXCR4 étaient supposés maintenir une relation exclusive, compte tenu des phénotypes similaires des souris invalidées pour l'un ou l'autre gène. L'identification d'un nouveau RCK pour CXCL12, RDC1 rebaptisé CXCR7, contredit ce postulat et implique de déterminer les contributions des deux récepteurs dans les activités de CXCL12 [4].

Voies de signalisation associées à l'activation et l'inactivation de CXCR4

En réponse à la fixation de CXCL12 à CXCR4, deux phénomènes se produisent (Figure 1). Un changement conformationnel de CXCR4 déclenche l'activation des protéines G et la mobilisation de différents effecteurs intracellulaires impliqués dans la réponse cellulaire (exemple : la chimiotaxie). Ensuite, l'activation des protéines G est rapidement atténuée par un système de rétrocontrôle négatif, appelé désensibilisation, qui débute par des phosphorylations ciblant des résidus aminés de type sérine/thréonine (Ser/Thr) situés dans le domaine intracellulaire carboxy-terminal (C-ter) du RCK par des kinases spécifiques, les *G protein-coupled receptor kinases* (GRK). Ces réactions conduisent au recrutement de protéines adaptatrices, les β -arrestines (β -arr), qui empêchent le couplage de CXCR4 à une nouvelle protéine G et connectent le RCK à de nouvelles voies de signalisation gouvernant notamment son endocytose. Le RCK subit également des modifications post-traductionnelles (exemple : l'ubiquitylation) qui l'orientent vers la dégradation lysosomale. Néanmoins, le RCK internalisé peut être directement recyclé à la membrane [3]. Des anomalies ciblant des étapes différentes de la signalisation de CXCR4 ont été identifiées dans deux déficits immunitaires rares chez l'homme : la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique (LCI) et le syndrome WHIM (SW, ou *warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome*). La LCI est associée à une altération du recyclage membranaire de CXCR4 qui entraîne une perte de fonction du RCK, alors que le SW est lié à un défaut d'inactivation de CXCR4 qui se traduit par un gain de fonction [5, 6]. Cette revue présente comment l'étude de ces maladies a permis de décrypter le mode d'action moléculaire de l'axe CXCL12/CXCR4, et réciproquement, comment ces avancées mécanistiques ont permis de mieux comprendre leur physiopathologie et d'envisager des voies thérapeutiques futures.

Bases moléculaires de la perte de fonction de CXCR4 dans la LCI

Physiopathologie

La LCI est un déficit immunohématologique rare associant un nombre faible et persistant de LT CD4⁺ circulants, en absence d'infection par le VIH ou d'autres causes connues d'immunodéficience, et des infections opportunistes sévères [7]. Son étiologie n'impliquerait

pas d'agent transmissible. Sur un plan immunologique, les LT CD4⁺ naïfs sont préférentiellement affectés dans le sang, alors que le nombre de LT CD8⁺ est préservé ou parfois diminué, constituant alors un facteur aggravant [8]. Une altération fréquente consiste en une augmentation sérique d'interleukine-7 (IL-7), compatible avec le déclenchement d'une réponse homéostatique qui vise à reconstituer le taux de LT CD4⁺ [9]. Des études rapportent une diminution des réponses des LT, une augmentation de leur activation et une capacité accrue à entrer en apoptose [10]. Une altération de la capacité clonogénique des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse pourrait également contribuer à la déplétion des LT CD4⁺ [11]. La LCI apparaît donc comme une maladie complexe, probablement multifactorielle, dont la pathogenèse reste à définir. Un enjeu consiste à déterminer si la LCI résulte d'un défaut de production thymique ou d'une consommation périphérique accélérée des lymphocytes T. Les CK/RCK, et en particulier l'axe CXCL12/CXCR4, constituaient une piste à explorer. Le couple CXCL12/CXCR4 dirige la thymopoïèse et régule la domiciliation des LT dans les organes lymphoïdes secondaires [12, 13]. Une perte ou un gain d'expression de *Cxcr4* chez la souris conduit à une diminution des LT CD4⁺ circulants associée respectivement à un défaut de la maturation thymique et à une migration exaceribée vers la moelle osseuse [14, 15]. Une altération de l'expression et/ou de l'activité membranaire de CXCR4 impacte donc sévèrement la différenciation des LT CD4⁺, conduisant à leur déplétion sanguine.

Association de la LCI à un défaut d'expression membranaire de CXCR4

Nous avons récemment identifié un mécanisme pathogénique impliquant CXCR4, associé à la déplétion des LT CD4⁺ et commun à tous les patients étudiés [5]. Les LT CD4⁺ circulants résiduels de 6 patients partagent un défaut d'expression membranaire de CXCR4 qui entraîne une perte de fonction, comme en témoigne l'hyposensibilité à l'action chimiotactique de CXCL12 (Figure 2). Or, l'expression et la fonction membranaires de CXCR4 dans les monocytes, et celles d'autres RCK (exemple : CCR5) dans les LT sont préservées, suggérant une anomalie restreinte aux LT et spécifique à CXCR4. Celle-ci est associée à une accumulation intracellulaire de CXCR4 et CXCL12, mais également à une incapacité du recyclage de RCK vers la surface. Aucune mutation dans *CXCL12* et *CXCR4* ou modification des niveaux plasmatiques de cytokines pouvant expliquer cette disparition membranaire n'a été identifiée. Sur le plan clinique, l'IL-2, *in vitro* et

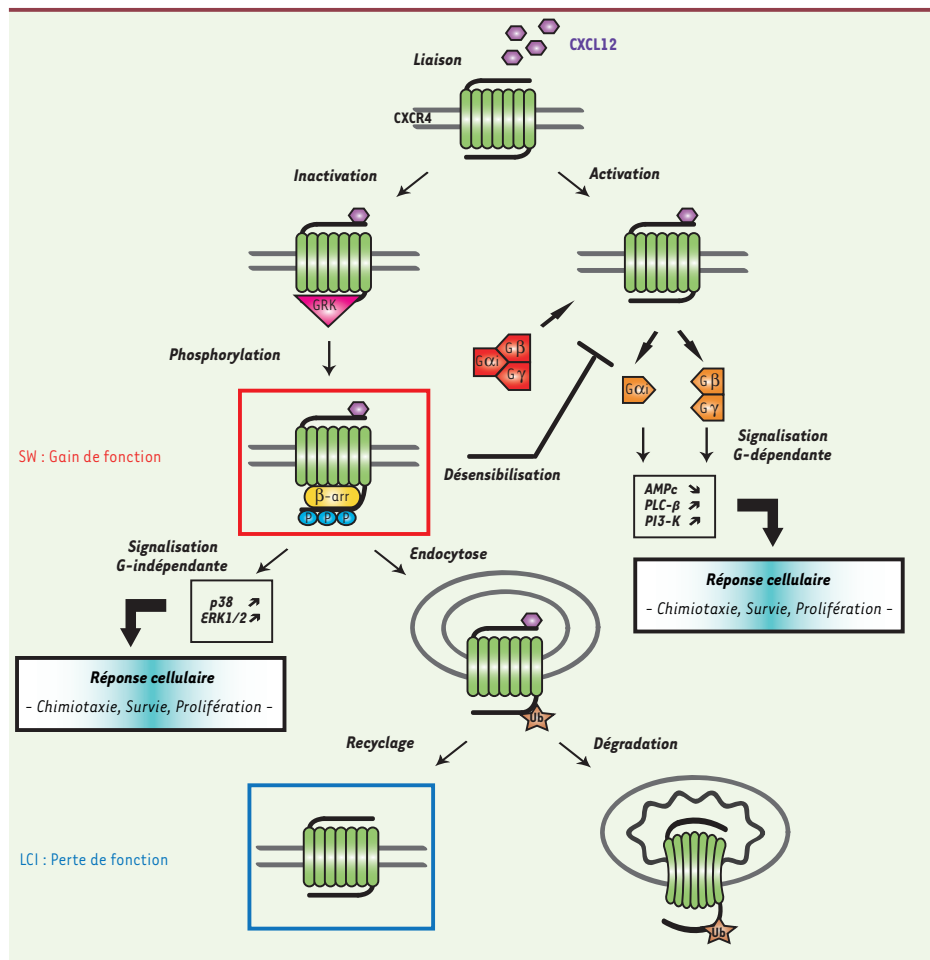


Figure 1. Régulation de l'activité de CXCR4. Ce schéma présente les principales voies de signalisation associées à l'activation et à l'inactivation de CXCR4 en réponse à CXCL12. Dans le SW, la désensibilisation de CXCR4 est altérée (cadre rouge), tandis que dans la LCI, il s'agit d'un défaut de recyclage membranaire de CXCR4 (cadre bleu). AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; β -arr : β -arrestine ; ERK : *extracellular signal-regulated kinase* ; $G\alpha\beta\gamma$: protéine G hétérotrimérique $\alpha\beta\gamma$; GRK : *G protein-coupled receptor kinase* ; LCI : lymphopénie T CD4⁺ idiopathique ; P : phosphorylation ; PI3-K : *phosphoinositide 3-kinase* ; PLC- β : *phospholipase C- β* ; SW : syndrome WHIM ; Ub : ubiquitine.

remarquablement *in vivo* chez certains patients, normalise l'expression membranaire de CXCR4 tout en augmentant le nombre de LT CD4⁺ circulants. Ainsi, cette étude ouvre pour la première fois la voie à la compréhension des anomalies moléculaires affectant les LT CD4⁺ et à un traitement de la LCI par immunothérapie.

Perte de fonction de CXCR4, une cause de la LCI ?

Ces données, qui méritent d'être étendues à d'autres cohortes, suggèrent que la perte de fonction de CXCR4 altère *in vivo* la différenciation des LT CD4⁺, conduisant à leur déplétion sanguine et favorisant ainsi l'appa-



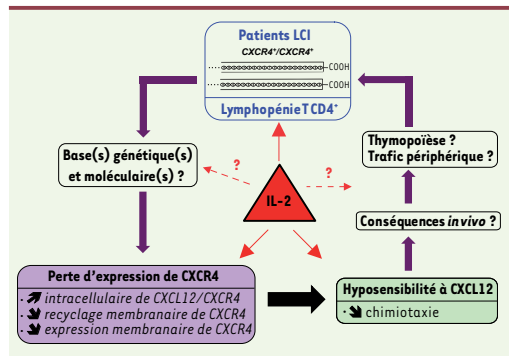


Figure 2. Association de la LCI à une perte de fonction de CXCR4. Ce schéma présente les principales étapes à éclaircir afin d'établir un lien causal entre l'anomalie de CXCR4 et la LCI, ainsi que les différentes hypothèses relatives à l'effet thérapeutique de l'IL-2. IL-2 : interleukine-2.

rition d'infections opportunistes. Plusieurs points restent à éclaircir afin d'établir un lien causal entre cette anomalie et la LCI (Figure 2). Les bases moléculaires de l'anomalie du trafic intracellulaire de CXCR4 et les conséquences *in vivo* sur l'homéostasie des LT CD4⁺ de la perte d'expression membranaire qui en résulte restent à définir. L'effet bénéfique de l'IL-2 chez certains patients suggère également une implication dans la LCI des cytokines messagères du système immunitaire dont les récepteurs partagent la chaîne γ -commune (IL-2, -4, -7, -9, -15 et -21). Un défaut de réponse à celles-ci pourrait conduire à une réduction de l'expression membranaire de CXCR4, perturbant ainsi l'homéostasie des LT CD4⁺. Il reste à déterminer par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) l'IL-2 restaure l'expression de CXCR4 et à identifier quelle étape de la vie du LT CD4⁺ est normalisée par cette intervention.

Bases moléculaires du gain de fonction de CXCR4 dans le syndrome de WHIM

Physiopathologie

Le SW est un déficit immunohématologique rare de transmission autosomique dominante qui se caractérise par une abondance de verrues (W, Warts) liées à des infections récurrentes par le virus du papillome humain, une hypogammaglobulinémie (H, HGG), des infections bactériennes à répétition (I) et une rétention anormale de neutrophiles matures dans la mole osseuse (M, Myelokathexis) [16]. Ce tableau s'associe invariablement à une leucopénie circulante qui affecte les neutrophiles, les lymphocytes T et B, parfois les monocytes et les cellules dendritiques [17, 18]. L'HGG, bien qu'étant variable, affecte surtout les IgG [19]. Une manifestation clinique de ces perturbations immunologiques serait la susceptibilité des patients à des épisodes infectieux itératifs, bactériens et essentiellement respiratoires [17].

Cependant, en réponse à une immunisation par un antigène T-dépendant, les patients produisent une réponse humorale spécifique, bien que les titres sériques déclinent rapidement. Le SW est donc caractérisé par un désordre de la migration leucocytaire, ce qui évoque une anomalie des CK/RCK. L'année 2003 marque un tournant décisif avec l'identification de mutations localisées dans la région codante de CXCR4 chez certains patients [20].

Association du SW à un défaut d'inactivation de CXCR4

La majorité des cas est liée à des mutations hétérozygotes dans CXCR4 qui invalident les 10 à 19 derniers acides aminés riches en sites Ser/Thr du domaine carboxy-terminal du RCK WHIM^{muté(m)} (Figure 3) [3, 17]. Des formes familiales sans anomalie de CXCR4 ont également été identifiées, WHIM^{sauvage(s)}, soulignant une hétérogénéité génétique du SW [6, 20]. L'intégrité du domaine carboxy-terminal étant requise pour l'inactivation de CXCR4 (Figure 1), il était logique de suspecter que les mutations altèrent ce processus et conduisent à un gain de fonction du RCK. Diverses études indiquent qu'effectivement ces différentes mutations conduisent à l'expression de RCK tronqués avec une activation accrue des protéines G, et ce malgré une expression membranaire normale [17]. Ceci s'explique par l'incapacité du CXCR4^{muté} à être découplé des protéines G (ou désensibilisé) et internalisé en réponse à la liaison de CXCL12. Cette anomalie de l'inactivation se traduit par un gain de fonction de CXCR4, comme l'illustre l'hypersensibilité des leucocytes de ces patients à l'action chimiotactique de CXCL12. De plus, les leucocytes de patients WHIM^s présentent des dysfonctionnements spécifiques de CXCR4 semblables à ceux qui sont décrits chez les patients WHIM^m (Figure 3) [6]. Malgré leurs différences génétiques, les deux formes du SW présentent donc comme élément pathogénique commun un gain de fonction de CXCR4. Cependant, chez les patients WHIM^m, les bases moléculaires de l'hyperactivité du RCK tronqué et son rôle étiologique dans les manifestations cliniques restaient à définir. Chez les patients WHIM^s, l'activité d'autres RCK, dont CXCR7, est préservée, suggérant l'existence d'une anomalie qui affecte un régulateur de l'inactivation de CXCR4. L'étude des partenaires intracellulaires de CXCR4 a récemment permis d'apporter des éléments de réponse sur les mécanismes mis en jeu.

Altération du système GRK/ β -arr dans le SW

Dans la forme WHIM^m, CXCR4^{muté} est réfractaire à la désensibilisation et à l'endocytose, ce qui signifie que l'intégrité du domaine carboxy-terminal est requise

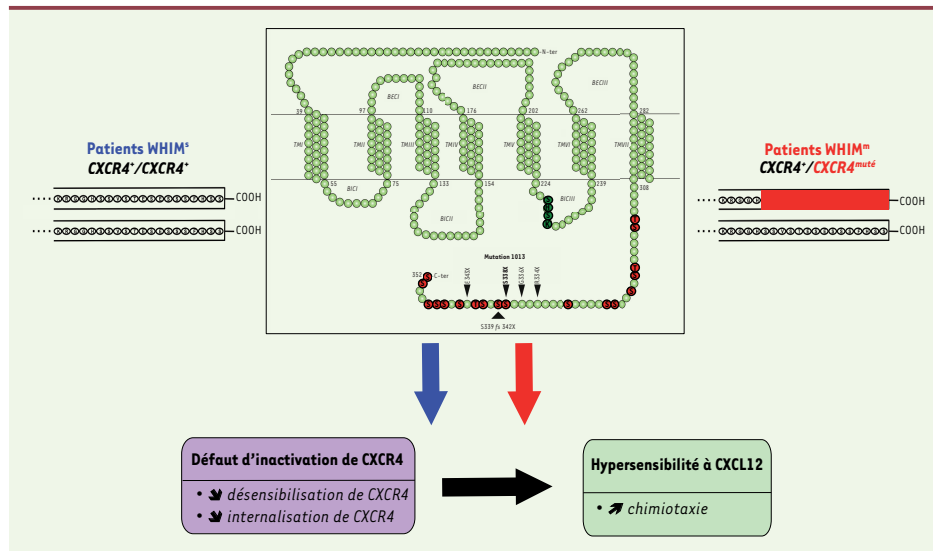


Figure 3. Association du SW à un défaut d'inactivation de CXCR4. Les mutations liées au SW (flèches noires) affectent le domaine intracellulaire carboxy-terminal de CXCR4, lequel contient 18 sites Ser/Thr (en rouge). Pour exemple, la mutation hétérozygote ponctuelle en position 1013 (substitution S338X) conduit à l'apparition prématurée d'un codon non-sens et entraîne une délétion des 15 derniers résidus aminés, dont 10 Ser/Thr (CXCR4¹⁰¹³). Le motif SHSK contenu dans la troisième boucle intracellulaire de CXCR4 est impliqué dans la liaison des β -arr (en vert). BEC : boucle extracellulaire ; BIC : boucle intracellulaire ; C-ter : carboxy-terminal ; fs : décalage du cadre de lecture ; N-ter : amino-terminal ; S : Ser ; SHSK : Ser/His/Ser/Lys ; T : Thr ; TM : domaine transmembranaire ; WHIM^Δ : porteurs d'une mutation dans CXCR4 ; WHIM^Δ : sans anomalie de CXCR4.

pour l'inactivation du RCK via sa phosphorylation par des GRK et la liaison des β -arr (Figure 1). En ce sens, la surexpression de β -arr ne normalise pas l'atténuation du RCK tronqué CXCR4¹⁰¹³ (Figure 3) [21]. Cependant, CXCR4¹⁰¹³ est capable d'interagir avec les β -arr via un domaine distinct de son extrémité carboxy-terminale : le motif Ser/His/Ser/Lys (SHSK) contenu dans la troisième boucle intracellulaire (BIC). Cette liaison est associée à l'induction de voies de signalisation G-indépendantes qui régulent positivement la chimiotaxie (Figure 1). Cet apparent paradoxe témoigne de l'ambivalence des β -arr dont les fonctions suppressives de la signalisation G-dépendante ou promotrices de la signalisation G-indépendante dépendent probablement du type de la GRK qui est recrutée et du site de fixation sur CXCR4 [3]. Ainsi, l'hypersensibilité à CXCL12 pourrait résulter d'une anomalie d'inactivation de CXCR4¹⁰¹³ (conséquence d'un défaut de recrutement des β -arr au domaine carboxy-terminal) et d'une signalisation G-indépendante exacerbée (liée à un recrutement favorisé des β -arr à la 3^e BIC). L'identification d'hétérodimères CXCR4¹⁰¹³/CXCR4⁺ suggère un mécanisme par lequel CXCR4^{muté} exerce un effet dominant négatif sur CXCR4⁺ [21]. Dans la forme WHIM^Δ, nous avons montré un rôle-clé de la GRK-3 dans la régulation de l'inactivation de CXCR4 [22]. L'extinction de GRK-3 dans des cellules de témoins reproduit des anoma-

lies de CXCR4 similaires à celles documentées chez les patients. Inversement, la surexpression de GRK-3 dans les cellules de patients corrige le défaut de désensibilisation et d'internalisation de CXCR4 et normalise la chimiotaxie induite par CXCL12. Fait marquant, un déficit sélectif de la protéine GRK-3, qui résulte d'un défaut de synthèse des ARNm, a été identifié chez un des patients. Ces données révèlent une spécialisation de la GRK-3 dans l'atténuation de CXCR4 et identifient de surcroît chez les patients WHIM^Δ une dérégulation de cette kinase comme une nouvelle anomalie liée au SW.

Interactome « CXCR4/GRK/ β -arr » défectueux dans le SW ?

Il faut encore décrypter plusieurs étapes afin d'élucider la physiopathologie du SW et d'envisager de manipuler l'axe CXCL12/CXCR4 à des fins thérapeutiques. Dans la forme WHIM^Δ, à l'instar de la démonstration formelle de la fonction dominante du CXCR4^{muté} sur la forme sauvage, la spécialisation des différentes GRK reste à définir dans les voies de signalisation



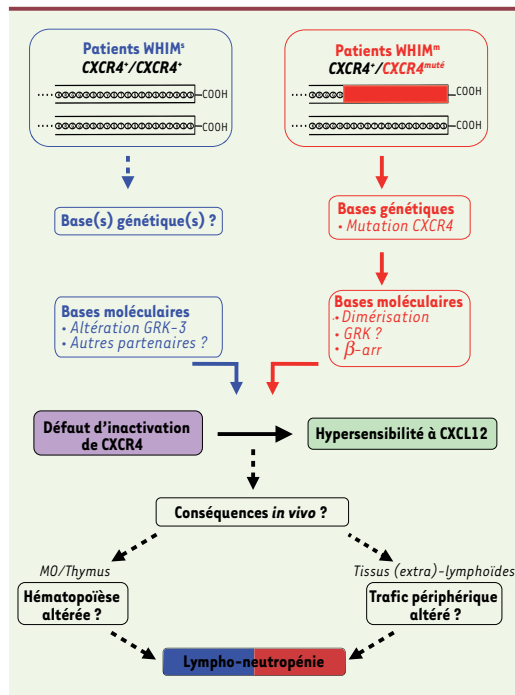


Figure 4. Mécanisme et impact sur l'homéostasie leucocytaire du gain de fonction de *CXCR4* dans le SW. Ce schéma rapporte les avancées récentes dans la compréhension des bases moléculaires du gain de fonction de *CXCR4* et indique les étapes-clés à caractériser afin d'élucider la physiopathologie du SW. MO : moelle osseuse.

β -arr-dépendantes du RCK tronqué. C'est pourquoi la production de souris hétérozygotes pour une mutation dans *CXCR4* est requise. La caractérisation immunologique d'un tel modèle permettra également de déterminer à quelle(s) étape(s) l'hyperactivité du *CXCR4*^{muté} perturbe *in vivo* l'homéostasie leucocytaire et conduit à une lympho-neutropénie (Figure 4). Dans la forme WHIM^s, les défauts génétiques impliqués, la nature des interactions *CXCR4*/GRK-3 et les conséquences *in vivo* d'une anomalie qui affecte la GRK-3 sur l'homéostasie leucocytaire sont à déterminer (Figure 4). La caractérisation de ces étapes est cruciale pour comprendre comment une altération de l'expression et/ou de l'activité de la GRK-3 conduit à un défaut d'inactivation de *CXCR4*, et par extension, aux manifestations cliniques. Son rôle pourrait impliquer la phosphorylation de sites Ser/Thr au sein du domaine carboxy-terminal de *CXCR4*, permettant ainsi la liaison des β -arr. Notre observation que la surexpression de *GRK-3* ne normalise pas l'inactivation du *CXCR4*¹⁰¹³ est un argument supplémentaire [22]. De fait, un défaut de liaison de la GRK-3 à

CXCR4 pourrait contribuer au gain de fonction du RCK dans les deux formes du SW. Néanmoins, de récents travaux indiquent qu'outre la GRK-3, les GRK-2 et -6 sont capables de lier le domaine carboxy-terminal de *CXCR4* à des endroits distincts et de réguler différents aspects de la signalisation [23, 24]. Cela soulève la possibilité que des défauts fonctionnels de chacune de ces kinases contribuent aux anomalies de *CXCR4*.

Conclusion

La LCI et le SW possèdent un dénominateur commun, une anomalie de *CXCR4*, qui affecte cependant des étapes différentes de la signalisation du RCK, ce qui conduit à des phénotypes fonctionnels opposés. La LCI est associée à un défaut de recyclage membranaire de *CXCR4* qui entraîne une perte de fonction, tandis que le SW est lié à un défaut d'inactivation du RCK qui se traduit par un gain de fonction. Ces anomalies pourraient affecter des stades distincts de la vie des leucocytes, ce qui aurait pour conséquence une déplétion des LT CD4⁺ dans la LCI et une leucopénie dans le SW, mais ceci doit être élucidé. Un modèle animal du SW serait d'un apport indéniable, d'autant qu'il permettrait d'évaluer les vertus pharmacologiques des inhibiteurs de l'axe CXCL12/*CXCR4*. L'AMD3100, un antagoniste sélectif de *CXCR4* et connu pour ses propriétés mobilisatrices fait figure de bon candidat et pourrait orienter l'arsenal thérapeutique chez les patients dont la prise en charge n'est actuellement pas spécifique [25]. Dans la LCI, il reste à déterminer le rôle étiologique de l'anomalie de *CXCR4*, d'autant que l'hétérogénéité des profils immunologiques des patients suggère une étiologie multifactorielle. L'étude *princeps* montre qu'un traitement *in vitro* ou *in vivo* par l'IL-2 normalise la fonction de *CXCR4*. Le seul patient chez lequel aucune amélioration du taux de LT CD4⁺ n'est observée lors de ce traitement est celui pour lequel l'anomalie de *CXCR4* est réfractaire aux effets bénéfiques de l'IL-2 [5]. Ceci soulève la possibilité qu'une correction de l'anomalie de *CXCR4* *in vitro* soit prédictive d'un succès thérapeutique. La modélisation de ces maladies permettra également d'identifier de nouveaux partenaires moléculaires de *CXCR4* et de définir leur contribution à l'activité du RCK. Ces candidats pourraient constituer les cibles de nouvelles approches thérapeutiques. Enfin, on peut concevoir d'instaurer une veille systématique des immunodéficiences « non étiquetées » dont la sémiologie suggère un désordre de la migration leucocytaire, et de fait, une anomalie des RCK. L'identification d'un nouveau déficit immunitaire lié à une anomalie de *CXCR4*, différent de la LCI et du SW et prédisposant à des infections à mycobactéries, en est le parfait exemple [26]. ♦

SUMMARY

CXCR4, a therapeutic target in rare immunodeficiencies?

Currently, more than 200 primary immunodeficiency diseases have been discovered. In most cases, genetic defects affect the expression or the function of proteins involved in immune development and homeostasis. Some orphan immuno-hematological disorders are characterized by an abnormal leukocyte trafficking, a notion predictive of an anomaly of the chemokine/chemokine receptor system. In this review, we focus on recent advances in the characterization of dysfunctions of the CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 signaling axis in two rare human immunodeficiencies, one associated with a loss of CXCR4 function, the Idiopathic CD4⁺ T-cell lymphocytopenia, and the other with a gain of CXCR4 function, the WHIM syndrome. ◊

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), l'Assistance publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP, contrat n° 07018), l'Université Paris-Sud, l'Union européenne (FP6, INNOCHEM, contrat n° LSHB-CT-2005-518167), l'Agence nationale de la recherche (ANR, contrat Jeunes chercheurs) et l'Association pour la recherche sur le cancer (ARC, contrat n° 4982) pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES

1. Mackay CR. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 988-98.
2. Desjardins SF, Berchiche YA, Haddad E, Heveker N. CXCR4, un récepteur de chimiokine aux multiples talents. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 980-84.
3. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1768 : 952-63.
4. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 35760-6.
5. Scott-Algara D, Balabanian K, Chakrabarti LA, et al. Idiopathic CD4⁺ T-cell lymphocytopenia is associated with impaired membrane expression of the chemokine receptor CXCR4. *Blood* 2010 ; 115 : 3708-17.
6. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 2005 ; 105 : 2449-57.
7. Luo L, Li T. Idiopathic CD4 lymphocytopenia and opportunistic infection-an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008 ; 54 : 283-9.
8. Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, et al. Idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood* 2008 ; 112 : 287-94.
9. Malaspina A, Moir S, Chaitt DG, et al. Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood* 2007 ; 109 : 2086-8.

10. Walker UA, Warnatz K. Idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Curr Opin Rheumatol* 2006 ; 18 : 389-95.
11. Isgro A, Sirianni MC, Gramiccioni C, et al. Idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia may be due to decreased bone marrow clonogenic capability. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 ; 136 : 379-84.
12. Cavazzana-Calvo M, Six E, André-Schmutz I, Coulombel L. Hématopoïèse humaine : des cellules CD34 aux lymphocytes T. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 151-9.
13. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 970-80.
14. Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, et al. Impairment of lymphopoiesis and myeloopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakinase. *Blood* 2000 ; 96 : 2074-80.
15. Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, et al. Disturbed CD4⁺ T cell homeostasis and *in vitro* HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 1439-49.
16. Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, et al. WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet* 2000 ; 91 : 368-76.
17. Kawai T, Malech HL. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol* 2009 ; 16 : 20-6.
18. Tassone L, Moratto D, Vermi W, et al. Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood* 2010 ; 116 : 4870-3.
19. Mc Guire PJ, Cunningham-Rundles C, Ochs H, Diaz GA. Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol* 2010 ; 135 : 412-21.
20. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 70-4.
21. Lagane B, Chow KY, Balabanian K, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 2008 ; 112 : 34-44.
22. Balabanian K, Levoye A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 1074-84.
23. McCormick PJ, Segarra M, Gasperini P, et al. Impaired recruitment of Grk6 and beta-Arrestin 2 causes delayed internalization and desensitization of a WHIM syndrome-associated CXCR4 mutant receptor. *PLoS One* 2009 ; 4 : e8102.
24. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, et al. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 7805-17.
25. Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 2010 ; 17 : 319-26.
26. Doncker AV, Balabanian K, Bellanne-Chantelot C, et al. Two cases of disseminated *Mycobacterium avium* infection associated with a new immunodeficiency syndrome related to CXCR4 dysfunctions. *Clin Microbiol Infect* 2010 ; 135-9.

TIRÉS À PART
K. Balabanian

REVUES



SYNTHÈSE



Biologie Aujourd'hui, 204 (4), 273-284 (2010)
© Société de Biologie, 2011
DOI: 10.1051/jbio/2010022

Anomalies de l'axe de signalisation CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 dans le syndrome WHIM et la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique

Vincent Biajoux^{1,2,*}, Alexandre Bignon^{1,2,*}, Laurence Bouchet-Delbos^{1,2,3}, Dominique Émilie^{1,2,4}
et Karl Balabanian^{1,2}

¹ Université Paris-Sud, Laboratoire « Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie », UMR S996, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart, France

² INSERM, 92140 Clamart, France

³ Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, 92140 Clamart, France

⁴ AP-HP, 92140 Clamart, France

Auteur correspondant : Karl Balabanian, karl.balabanian@u-psud.fr

Reçu le 9 juin 2010

Résumé – La chimiokine CXC *Stromal cell Derived Factor-1* (SDF-1/CXCL12) est l'unique ligand naturel de CXCR4, récepteur ubiquitaire à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, et agit comme un facteur chimiotactique pour différentes populations leucocytaires. L'axe CXCL12/CXCR4 est impliqué dans des processus homéostatiques comme l'organogenèse, l'hématopoïèse et la domiciliation leucocytaire. Des dérégulations des voies de signalisation et/ou de l'expression de CXCR4 ont été décrites dans certaines pathologies infectieuses, inflammatoires, auto-immunes et tumorales. Cette revue fait une mise au point sur les anomalies de CXCR4 récemment identifiées dans le syndrome WHIM et la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique, deux déficits immunitaires rares chez l'Homme associés respectivement à un gain et à une perte de fonction de CXCR4.

Mots clés : Immunodéficience rare / chimiokines / CXCL12 / CXCR4 / transduction du signal

Abstract – Dysfunctions of the CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 signaling axis in the WHIM syndrome and the idiopathic CD4⁺ T-cell lymphocytopenia.

Chemokines are small cytokine-like secreted proteins that govern migration of leukocytes to their specific niches in lymphoid organs and to inflammatory sites. They mediate their functions by binding to and activating chemokine receptors, which belong to the heptahelical G protein-coupled receptor family. The CXC chemokine Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) is the sole natural ligand for the broadly expressed CXCR4 receptor and acts as a chemoattractant for many leukocyte subsets. The CXCL12/CXCR4 axis exerts critical activities in homeostatic processes such as organogenesis, hematopoiesis and leukocyte trafficking. Dysregulations of CXCR4 signaling and/or expression are associated with several infectious, inflammatory, autoimmune and malignant conditions. In light of recent data, we review here CXCR4 dysfunctions unveiled in two rare human immunodeficiency disorders, one characterized by a gain of CXCR4 function, the WHIM syndrome, and the other by a loss of CXCR4 function, the idiopathic CD4⁺ T-cell lymphocytopenia.

Key words: Rare immune defect / chemokines / CXCL12 / CXCR4 / signal transduction

* contribution égale

Abréviations

AA :	Acide aminé
β -arr :	β -arrestine
BIC :	Boucle intracellulaire
CKs :	Chimiokines
CSHs :	Cellules souches hématopoïétiques
C-ter :	C-terminal
GRKs :	<i>G protein-coupled receptor kinases</i>
IL-2 :	Interleukine-2
LB :	Lymphocyte B
LCI :	Lymphopénie T CD4 ⁺ idiopathique
LT :	Lymphocyte T
MO :	Moelle osseuse
OLs :	Organes lymphoïdes
RCKs :	Récepteurs de chimiokines
SDF-1 :	<i>Stromal cell Derived Factor-1</i>
Ser :	Sérine
SHSK :	Sérine/Histidine/Sérine/Lysine
SW :	Syndrome WHIM
Thr :	Thréonine
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
WHIM ^m :	Porteur d'une mutation hétérozygote dans <i>CXCR4</i>
WHIM ^s :	Non porteur d'une mutation dans <i>CXCR4</i>

Introduction

Les chimiokines (CKs) sont des cytokines de faible poids moléculaire, sécrétées et dotées d'un pouvoir chimiotactique, qui gouvernent, de concert avec les molécules d'adhésion, le trafic lymphoïde des leucocytes à l'état basal et le recrutement de cellules effectrices au site de l'agression. Ces activités sont relayées par des récepteurs (RCKs), qui appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, lesquels constituent les cibles de près de la moitié des médicaments disponibles sur le marché (Proudfoot, 2002; Mackay, 2008). La chimiokine α CXC *Stromal cell Derived Factor-1* (SDF-1/CXCL12) est l'unique ligand naturel de CXCR4 (ou *Fusin*), récepteur ubiquitaire et initialement identifié comme un co-récepteur du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Feng *et al.*, 1996). CXCL12 agit comme un facteur chimioattractant pour les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) et différentes sous-populations leucocytaires (Lataillade *et al.*, 2004). CXCL12 est constitutivement exprimée par les cellules stromales, épithéliales et endothéliales, notamment dans les organes lymphoïdes (OLs) primaires, incluant la moelle osseuse (MO) et le thymus, et les OLs secondaires, parmi lesquels la rate et les ganglions (Nagasawa *et al.*, 1998).

D'un point de vue mécanistique, deux phénomènes moléculaires se produisent à la suite de l'engagement de CXCR4 par CXCL12. Premièrement, un changement conformationnel de CXCR4 initie l'activation des protéines G puis la mobilisation de différents effecteurs intracellulaires impliqués dans la réponse cellulaire (ex : migration, prolifération, survie). Deuxièmement, des événements de phosphorylation, médiés par des kinases spécifiques et ciblant le domaine intracellulaire C-terminal (C-ter) du RCK, conduisent au recrutement de protéines adaptatrices, les β -arrestines (β -arr), qui gouvernent alors l'inactivation et le trafic intracellulaire de CXCR4 (figure 1). L'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 joue un rôle central dans des processus tels que la cardiogénèse, la vasculogénèse, la neurogénèse, la domiciliation des CSHs au sein de la MO, l'hématopoïèse et le trafic leucocytaire (Ma *et al.*, 1998; Raz, 2004; Ratajczak *et al.*, 2006). Des dérégulations des voies de signalisation et/ou de l'expression de CXCR4 ont été identifiées dans diverses situations pathologiques incluant l'infection par le VIH, certaines maladies auto-immunes, neurodégénératives et cardiovasculaires, ainsi que le développement de tumeurs épithéliales primaires (Balkwill, 2004; Busillo & Benovic, 2007; Kryczek *et al.*, 2007; Tsutsumi *et al.*, 2007; Gross & Meier, 2009; Rubin, 2009).

CXCL12 et CXCR4 sont supposés maintenir une relation mutuelle et exclusive, compte tenu des phénotypes similaires des souris invalidées pour l'un ou l'autre gène (Ma *et al.*, 1998). Cependant, l'identification récente d'un nouveau RCK pour CXCL12, à savoir RDC1/CXCR7, contredit ce postulat et implique à présent de déterminer les contributions respectives de CXCR4 et de CXCR7 dans les activités homéostatiques et pathologiques de CXCL12 (Balabanian *et al.*, 2005a). Par conséquent, les interactions établies entre CXCL12 et ses récepteurs en pathologie constituent une cible pertinente pour l'élaboration de nouvelles approches pharmacologiques à visée thérapeutique.

CXCR4, une cible thérapeutique dans certains déficits immunitaires rares ?

Récemment, des anomalies ciblant différentes étapes des voies de signalisation transduites par CXCR4 ont été identifiées dans deux déficits immuno-hématologiques rares chez l'Homme, l'un caractérisé par un gain de fonction de CXCR4, le syndrome WHIM (SW) (Balabanian *et al.*, 2005b; Balabanian *et al.*, 2008), et le second associé à une perte de fonction de CXCR4, la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique (LCI) (Scott-Algara *et al.*, 2010). À la suite de la liaison de CXCL12, l'activité de CXCR4 est régulée

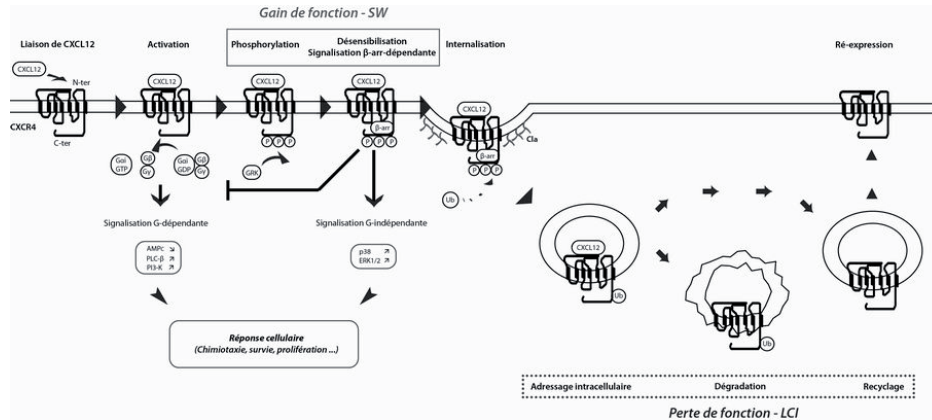


Fig. 1. Voies de signalisation et régulation de l'activité de CXCR4. Ce schéma décrit les principales voies de signalisation associées à l'activation et à l'inactivation de CXCR4 en réponse à CXCL12. La désensibilisation de CXCR4 est altérée dans le SW, alors que le recyclage membranaire de CXCR4 est défectueux dans la LCI. AMPc : Adénosine monophosphate cyclique; β -arr : β -arrestine; Cla : Clathrine; C-ter : C-terminal; ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*; $G\alpha\beta\gamma$: Protéine G hétérotrimérique $\alpha\beta\gamma$; GDP : Guanosine-5'-diphosphate; GRK : *G protein-coupled receptor kinase*; GTP : Guanosine-5'-triphosphate; CI : lymphopénie T CD4⁺ idiopathique; P : Phosphorylation; PI3-K : *Phosphoinositide 3-Kinase*; PLC- β : Phospholipase C- β ; SW : syndrome WHIM; Ub : Ubiquitine.

par différents processus moléculaires qui incluent la désensibilisation, l'internalisation, la dégradation et le recyclage membranaire (figure 1). L'activation des protéines G est rapidement atténuée par un système de rétrocontrôle négatif appelé désensibilisation, mécanisme par lequel CXCR4 devient réfractaire à une stimulation ultérieure par CXCL12. Ce processus débute par des phosphorylations ciblant des résidus aminés de type Sérine/Thréonine (Ser/Thr), principalement contenus dans le domaine intracellulaire C-ter du RCK, par des kinases spécifiques, les *G protein-coupled receptor kinases* (GRKs). Ces réactions enzymatiques conditionnent le recrutement et la liaison sur cette région de protéines aux multiples fonctions, les β -arr. Ces dernières empêchent le couplage de CXCR4 à de nouvelles protéines G et connectent le RCK à de nouvelles voies de signalisation qui gouvernent, notamment, son endocytose *via* les puits recouverts de clathrine. Ces processus sont nécessaires à l'atténuation de l'activité de CXCR4. Le RCK subit également des modifications post-traductionnelles de type ubiquitinylation, ce qui l'oriente vers la dégradation dans les compartiments lysosomaux. Cependant, le RCK internalisé peut être directement recyclé à la membrane cellulaire (Busillo & Benovic, 2007; Moore *et al.*, 2007).

De récents travaux révèlent que la désensibilisation de CXCR4 est défectueuse dans le SW, alors que le

recyclage membranaire de CXCR4 est altéré dans la LCI (figure 1). Le décryptage et la compréhension du mode d'action moléculaire et fonctionnel de l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 dans le SW et la LCI constituent des étapes préliminaires indispensables avant d'envisager de manipuler cet axe à des fins thérapeutiques. L'objectif de cette revue est de présenter l'état actuel des connaissances sur les anomalies de CXCR4 dans le SW et la LCI.

Physiopathologie du syndrome WHIM

Le SW est un déficit immuno-hématologique rare à transmission autosomique dominante, qui se caractérise par une abondance de verrues cutanées et de condylomes ano-génitaux dysplasiques liés à des infections récurrentes par le virus du Papillome Humain (W, « *Warts* »), une hypogammaglobulinémie (H), des infections bactériennes à répétition (I), et une forme de neutropénie congénitale associée à une rétention anormale de neutrophiles hypermatures au profil apoptotique dans la MO (M, « *Myelokathexis* ») (Zuelzer, 1964). Ce dernier critère constitue le signe pathognomonique du SW (Kawai & Malech, 2009). Contrairement à d'autres maladies héréditaires caractérisées par une neutropénie, les patients atteints du SW ne développent pas d'infections qui engagent

le pronostic vital. En effet, une infection aiguë, une stimulation par le *Granulocyte-Colony-Stimulating Factor*, l'adrénaline ou les glucocorticoïdes induisent une mobilisation rapide des neutrophiles de la MO vers le sang, et de fait, corrigent transitoirement la neutropénie circulante (Kawai & Malech, 2009; Notarangelo & Badolato, 2009).

Ces observations suggèrent que la neutropénie résulte d'une altération de la libération des neutrophiles de la MO, plutôt que d'une anomalie de leur production.

Ce tableau s'associe invariablement à une profonde leucopénie, qui affecte les lymphocytes T (LT) et les LB circulants, et dans certains cas, les monocytes (Balabanian *et al.*, 2005b; Siedlar *et al.*, 2008). Des analyses immunophénotypiques ont révélé une diminution du nombre de LB mémoires et de LT naïfs et centraux/mémoires, contrastant avec l'accumulation de LT effecteurs/mémoires présentant un répertoire du récepteur T restreint (Gulino *et al.*, 2004). L'hypogammaglobulinémie, bien qu'étant un paramètre variable, affecte principalement les IgG (Mc Guire *et al.*, 2010). Une manifestation clinique probable serait l'apparente susceptibilité des patients à développer chroniquement des sinusites, des infections respiratoires et des pneumonies causées par des bactéries encapsulées. Cependant, à la suite d'une immunisation par un antigène T-dépendant, les patients semblent capables de produire une réponse humorale spécifique, bien que les titres sériques déclinent rapidement (Gulino *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données cliniques et immunologiques indique que le SW est caractérisé par un désordre de la migration leucocytaire, une notion prédictive d'une anomalie du système des CKs/RCKs. L'année 2003 marque un tournant décisif avec l'identification de mutations hétérozygotes localisées dans la région codante de *CXCR4* chez certains patients souffrant du SW (Hernandez *et al.*, 2003). Les bases moléculaires liant cette anomalie génétique à un dysfonctionnement cellulaire restaient alors à définir.

Gain de fonction de CXCR4 dans le syndrome WHIM

La majorité des cas répertoriés de SW est liée à des mutations hétérozygotes localisées dans *CXCR4*, qui tronquent partiellement le domaine intracellulaire C-ter du RCK [WHIM^{muté(m)}; génotype : *CXCR4*⁺/*CXCR4*^{muté}] (figure 2) (Hernandez *et al.*, 2003; Kawai & Malech, 2009; Takaya *et al.*, 2009; Tassone *et al.*, 2009). L'intégrité de ce domaine étant requise pour l'inactivation de CXCR4 (figure 1), il était logique de suspecter que les mutations tronquantes altèrent ce processus et conduisent à un gain de fonction de CXCR4. L'utilisation de LT et de

neutrophiles circulants résiduels de patients [WHIM^m] et la production de lignées cellulaires surexprimant un *CXCR4*^{muté} ont permis de révéler qu'effectivement ces différentes mutations mènent à l'expression de RCKs tronqués qui présentent une activation accrue et soutenue des protéines G (Busillo & Benovic, 2007; Notarangelo & Badolato, 2009). Ce phénomène s'explique par l'incapacité du *CXCR4*^{muté} à être découplé des protéines G (ou désensibilisé) et internalisé après la liaison de CXCL12 (Balabanian *et al.*, 2005b). Cette anomalie du processus d'inactivation se traduit par un gain de fonction de CXCR4, comme l'illustre l'hyper-sensibilité des leucocytes à l'action chimiotactique de CXCL12, et ce malgré une expression membranaire normale du RCK (figure 3).

Quelques formes familiales sans anomalie de *CXCR4* ont également été identifiées [WHIM^{sauvage(s)}; génotype : *CXCR4*⁺/*CXCR4*⁺], indiquant une hétérogénéité génétique du SW (Balabanian *et al.*, 2005b). Fait intéressant, les leucocytes de patients [WHIM^s] présentent des dysfonctions spécifiques de l'axe CXCL12/CXCR4, semblables à celles documentées chez les patients [WHIM^m] (figure 3). En dépit de leurs différences génétiques, les deux formes du SW présentent donc comme élément pathogénique commun un gain de fonction de CXCR4, qui est probablement à l'origine des manifestations immuno-hématologiques et infectieuses. À ce stade, plusieurs questions restaient à résoudre pour comprendre comment le gain de fonction de CXCR4 conduit au SW. Chez les patients [WHIM^m], les bases moléculaires de l'hyperactivité du RCK tronqué et son rôle étiologique dans les manifestations cliniques restaient à définir. Chez les patients [WHIM^s], l'activité d'autres RCKs, incluant celle de CXCR7, est préservée, suggérant l'existence d'une anomalie qui affecte un effecteur intracellulaire sélectivement impliqué dans la régulation de l'inactivation de CXCR4. Un éclairage mécanistique a récemment été apporté sur le gain de fonction de CXCR4 dans le SW via l'étude des partenaires intracellulaires du RCK.

Dans la forme [WHIM^m], le *CXCR4*^{muté} est réfractaire à la désensibilisation et à l'endocytose, soulignant que l'intégrité du domaine C-ter est requise pour l'inactivation du RCK via sa phosphorylation par certaines GRKs et la liaison des β -arr (figure 1). En accord avec cette notion, la surexpression de β -arr ne permet pas de restaurer l'atténuation du *CXCR4*^{muté} (Lagane *et al.*, 2008). Dans ces conditions expérimentales, le *CXCR4*^{muté} préserve cependant la capacité d'interagir avec les β -arr via un domaine distinct de son extrémité C-ter : le motif Ser/His/Ser/Lys (SHSK) contenu dans la 3^e boucle intracellulaire (BIC) (figure 2). Cette liaison est associée à l'induction de voies de signalisation indépendantes

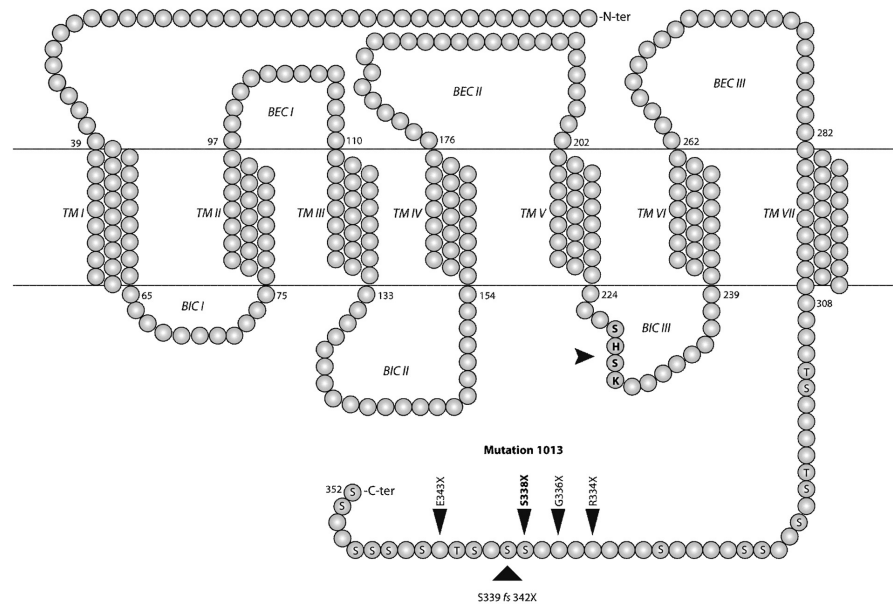


Fig. 2. Association du SW à des mutations de *CXCR4*. Toutes les mutations de *CXCR4* liées au SW invalident les 10 à 19 derniers acides aminés (AA) riches en sites Ser/Thr du domaine intracellulaire C-ter de la protéine. Par exemple, la mutation hétérozygote ponctuelle identifiée en position 1013 (substitution S338X) conduit à l'apparition prématurée d'un codon non-sens et entraîne une délétion partielle (15 derniers AA) du domaine C-ter de *CXCR4*. Le motif SHSK contenu dans la 3^e boucle intracellulaire de *CXCR4* est impliqué dans la liaison des β -arr. BEC : boucle extracellulaire; BIC : boucle intracellulaire; fs : décalage du cadre de lecture; S : Ser; SHSK : Ser/His/Ser/Lys; T : Thr; TM : domaine transmembranaire.

des protéines G (ex : ERK1/2) qui régulent positivement la chimiotaxie (figure 1) (Premont & Gainetdinov, 2007). Cet apparent paradoxe témoigne de l'ambivalence des β -arr, dont les fonctions, suppressives de la signalisation G-dépendante ou promotrices de la signalisation G-indépendante, dépendent probablement du type de GRK recrutée et du site de fixation sur *CXCR4*. Selon ce modèle, l'hypersensibilité à l'action chimiotactique de CXCL12 dans la forme [WHIM^m] pourrait résulter d'une anomalie d'inactivation de *CXCR4* (conséquence à un défaut de recrutement des β -arr au domaine C-ter) et d'une signalisation exacerbée G-indépendante (liée à un recrutement favorisé des β -arr à la 3^e BIC). Enfin, l'identification d'hétérodimères entre *CXCR4*^{muté} et *CXCR4*⁺ suggère un mécanisme par lequel *CXCR4*^{muté} exerce un effet transdominant négatif sur *CXCR4*⁺ (Lagane *et al.*, 2008).

Bien que ces travaux apportent des éléments de réponse à propos des mécanismes moléculaires

mis en jeu dans l'hyperactivité de *CXCR4*^{muté}, la spécialisation des différentes GRKs reste encore à établir dans les voies de signalisation dépendantes des β -arr et médiées par le *CXCR4*^{muté}. Un autre objectif consiste à déterminer à quelle(s) étape(s) et par quel(s) mécanisme(s) l'hyperactivité de *CXCR4*^{muté} perturbe *in vivo* l'homéostasie leucocytaire et conduit à une lympho-neutropénie (figure 4). Une possibilité serait que la leucopénie résulte d'un défaut de l'hématopoïèse et/ou d'une altération de la domiciliation périphérique des leucocytes. Dans cette optique, la production et la caractérisation immunologique d'un modèle animal [WHIM^m] seraient informatives.

Une étude approfondie des cellules de patients [WHIM^s] a récemment permis de dévoiler un rôle clef de la protéine kinase GRK-3 dans la régulation de la désensibilisation et de l'internalisation de *CXCR4* (Balabanian *et al.*, 2008). En effet, l'extinction de *GRK-3* par l'utilisation d'ARNs interférents dans des

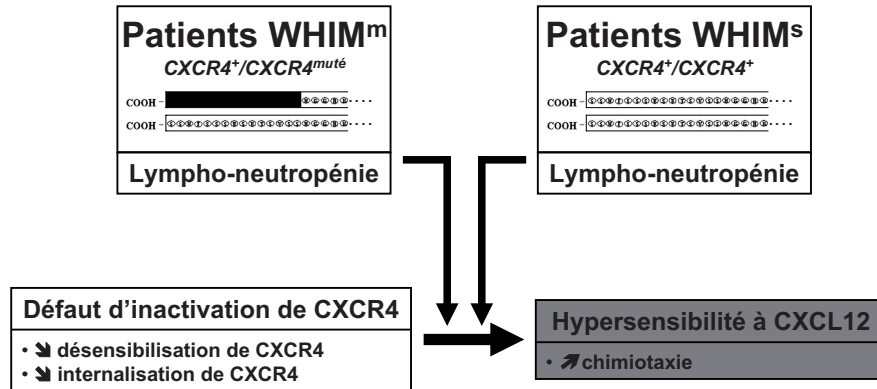


Fig. 3. Association du SW à un défaut d'inactivation de CXCR4. Le SW se caractérise notamment par une lympho-neutropénie circulante et présente une hétérogénéité de CXCR4. Les leucocytes de patients porteurs [WHIM^m] ou non [WHIM^s] d'une mutation dans *CXCR4* partagent un défaut d'inactivation de CXCR4, qui se manifeste par des anomalies de désensibilisation et d'internalisation du RCK et se traduit par une hypersensibilité à l'action chimiotactique de CXCL12.

cellules de témoins induit un défaut d'inactivation de CXCR4 et une chimiotaxie exacerbée en réponse à CXCL12, anomalies similaires à celles documentées chez les patients. Ces données identifient donc la GRK-3 comme un régulateur négatif de la migration cellulaire induite par CXCL12 et également comme un candidat responsable des dysfonctions de CXCR4 chez les patients [WHIM^s]. Dans ce sens, la surexpression de *GRK-3* dans leurs cellules corrige le défaut de désensibilisation et d'internalisation de CXCR4 et normalise la chimiotaxie induite par CXCL12. Fait marquant, un déficit sélectif de la protéine GRK-3, résultant d'un défaut de synthèse des ARNm, a été identifié chez un des patients. Par conséquent, ces données révèlent une spécialisation de la GRK-3 dans l'atténuation de CXCR4 et identifient de surcroît chez les patients [WHIM^s] une dérégulation de cette kinase comme une nouvelle anomalie liée au SW (figure 4).

Les défauts génétiques impliqués, la nature des interactions moléculaires entre CXCR4 et la GRK-3 et les conséquences sur l'homéostasie leucocytaire *in vivo* d'une anomalie affectant la GRK-3 restent cependant à établir (figure 4). La caractérisation de ces étapes est critique pour comprendre comment une altération de l'expression ou de l'activité de la GRK-3 conduit à un défaut d'inactivation de CXCR4, et par extension, aux manifestations cliniques. Le rôle sélectif de la GRK-3 dans l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 pourrait impliquer la phosphorylation de sites Ser/Thr contenus dans le domaine C-ter du RCK, permettant

ainsi la liaison des β -arr sur cette région. En accord avec cette hypothèse, la surexpression de β -arr ou de *GRK-3* ne corrige pas le défaut d'inactivation du CXCR4^{muté} (Balabanian *et al.*, 2008; Lagane *et al.*, 2008). De fait, une possibilité serait qu'un défaut de liaison de la GRK-3 à CXCR4 soit responsable du gain de fonction du RCK aussi bien dans la forme [WHIM^s] que [WHIM^m]. Actuellement, il n'existe aucun consensus sur d'autres partenaires moléculaires impliqués directement dans le SW. Néanmoins, des travaux récents indiquent, qu'en plus de la GRK-3, la GRK-2 et la GRK-6 sont capables de fixer le domaine C-ter de CXCR4 à des endroits distincts et de réguler différents aspects de la signalisation du RCK (McCormick *et al.*, 2009; Busillo *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent clairement que des défauts fonctionnels de chacune de ces kinases pourraient contribuer aux anomalies de CXCR4 dans le SW.

Physiopathologie de la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique

La LCI est une maladie immuno-hématologique rare qui correspond à un syndrome de déplétion en LT CD4⁺ circulants, dont la pathogenèse reste encore inconnue. Ce déficit se caractérise par la persistance d'un nombre faible de LT CD4⁺ (<300 cellules/mm³) en l'absence d'infection par le VIH, de déficit immunitaire identifié ou de traitement pouvant être à l'origine

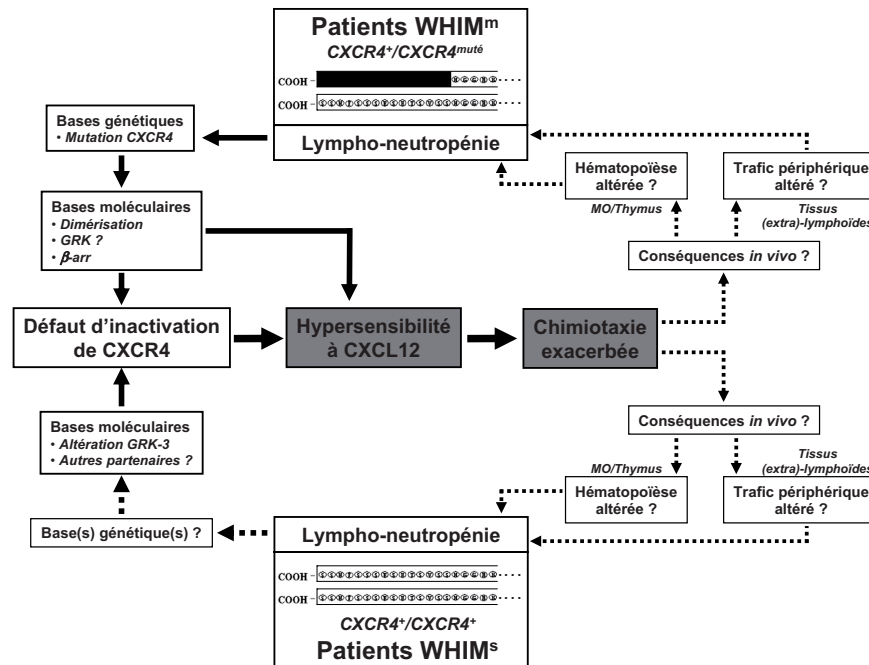


Fig. 4. Aspects moléculaires du gain de fonction de CXCR4 dans le SW. Ce schéma présente les dernières avancées (→) dans la compréhension des bases mécaniques du gain de fonction de CXCR4 chez les patients [WHIM^m] et [WHIM^s], et souligne les étapes critiques (•••→) à résoudre afin d'élucider la physiopathologie du SW. MO : moelle osseuse.

d'une baisse des LT CD4⁺ (Spira *et al.*, 1993). Ce syndrome a été décrit en 1992, époque à laquelle le *Center for Disease Control* d'Atlanta a répertorié 47 patients parmi 230179 répondant à ces critères (Smith *et al.*, 1993). L'anomalie des LT CD4⁺ favorise l'apparition d'infections opportunistes sévères, en particulier d'origine fongique (ex : *Cryptococcus neoformans*) (Zonios *et al.*, 2008). L'étiologie de la LCI n'impliquerait pas d'agents infectieux ou environnementaux mais pourrait avoir une origine génétique (Walker & Warnatz, 2006). Les patients présentent des profils immunologiques hétérogènes. Selon certaines études, les LT CD4⁺ naifs sont préférentiellement affectés dans le sang. Le nombre de LT CD8⁺ est préservé ou parfois diminué, constituant ainsi un facteur aggravant (Seligmann *et al.*, 1991, 1994). Une immunothérapie basée sur l'administration d'Interleukine-2 (IL-2) permet d'augmenter le nombre de LT CD4⁺ circulants chez certains patients (Warnatz *et al.*, 2000; Trojan *et al.*, 2009).

Quelques études à visée mécanistique et fonctionnelle ont rapporté une diminution des réponses des LT, une augmentation de l'activation des LT, et une capacité accrue des LT à entrer en apoptose, un processus partiellement dépendant de l'expression du récepteur Fas (Laurence *et al.*, 1996; Roger *et al.*, 1999; Netea *et al.*, 2004; Walker & Warnatz, 2006). Une anomalie de la capacité clonogénique des CSHs de la MO pourrait également contribuer à la déplétion des LT CD4⁺ (Isgro *et al.*, 2005). Une anomalie fréquente dans la LCI consiste en une augmentation sérique d'IL-7, compatible avec le déclenchement d'une réponse homéostatique visant à reconstituer le taux de LT CD4⁺ circulants (Malaspina *et al.*, 2007; Guimond *et al.*, 2009). La LCI apparaît donc comme une maladie complexe, probablement multifactorielle, dont les causes et les mécanismes pathogéniques restent encore incompris. Un des enjeux consiste à déterminer si la lymphopénie T CD4⁺ résulte d'un défaut de production thymique

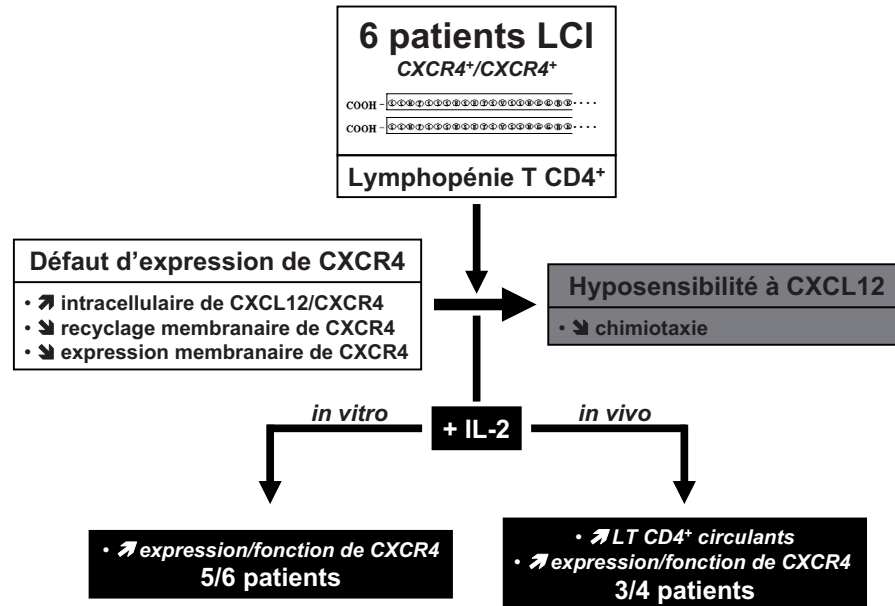


Fig. 5. Association de la LCI à un défaut d'expression membranaire de CXCR4. La LCI associe un nombre faible de LT CD4⁺ circulants et des infections opportunistes. Les LT CD4⁺ de six patients partagent un défaut de recyclage et d'expression membranaire de CXCR4, anomalies associées à une accumulation intracellulaire de CXCR4 et de CXCL12, entraînant une hyposensibilité à l'action chimiotactique de CXCL12. *In vitro* et remarquablement *in vivo* chez certains patients, l'IL-2 normalise l'expression et la fonction membranaire de CXCR4 tout en augmentant le nombre de LT CD4⁺ circulants. IL-2 : Interleukine-2; LT : lymphocytes T.

et/ou d'une consommation périphérique accélérée. Dans cette optique, les CKs/RCKs, et plus particulièrement l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4, constituaient une piste à explorer.

Perte de fonction de CXCR4 dans la lymphopénie T CD4⁺ idiopathique

Le couple CXCL12/CXCR4 orchestre la thymopoïèse et régule en périphérie la domiciliation et la différenciation des LT dans les OLS secondaires (Takahama, 2006; Patrussi & Baldari, 2008; Yu *et al.*, 2009). Compte tenu de ces activités pléiotropes, il est logique d'envisager qu'une altération de l'expression et/ou de l'activité de CXCR4 impacte sévèrement l'homéostasie des LT. En accord avec cette hypothèse, une perte ou un gain d'expression de CXCR4 chez la souris conduit à une diminution des LT CD4⁺ dans le sang (Sawada *et al.*, 1998; Onai *et al.*, 2000). Dans ces

modèles, la déplétion est associée respectivement à un défaut de la maturation intra-thymique et à une augmentation de la migration des LT CD4⁺ vers la MO. Ces études indiquent très clairement qu'une modulation de l'expression membranaire de CXCR4 perturbe la différenciation et la domiciliation des LT CD4⁺, conduisant à leur déplétion dans le sang.

Une étude récente a permis d'identifier un mécanisme pathogénique impliquant CXCR4, associé à la déplétion des LT CD4⁺ et commun à tous les patients étudiés (Scott-Algara *et al.*, 2010). En effet, les LT CD4⁺ circulants résiduels de six patients partagent un défaut d'expression membranaire de CXCR4 qui conduit à une perte de fonction de CXCR4, comme en témoigne l'hyposensibilité de ces cellules à l'action chimiotactique de CXCL12 (figure 5). En revanche, l'expression et la fonction membranaire de CXCR4 dans les monocytes, et celles d'autres RCKs (ex : CCR5, CXCR2) dans les LT, sont préservées, suggérant une anomalie restreinte aux LT et spécifique

à CXCR4. De manière surprenante, la perte d'expression membranaire de CXCR4 est associée à une accumulation intracellulaire du RCK, mais également de son ligand CXCL12. L'absence de mutations dans *CXCL12* ou *CXCR4* et de modifications des niveaux plasmatiques de cytokines qui puissent expliquer la disparition membranaire du RCK suggère un défaut de trafic intracellulaire du complexe CXCL12/CXCR4 (figure 1). De fait, les auteurs ont évalué *in vitro* le destin de CXCR4 dans les LT CD4⁺ de patients à la suite de la liaison de CXCL12. De cette manière, ils ont montré que CXCR4 subissait une internalisation normale en réponse à CXCL12, mais était ensuite incapable de se recycler vers la surface cellulaire. L'anomalie de compartimentalisation cellulaire de CXCR4, à savoir une diminution membranaire et une augmentation intracellulaire, affecte aussi bien les LT CD4⁺ naïfs que mémoires. Ces données indiquent que la perte d'expression de CXCR4 résulte d'un défaut de recyclage membranaire du RCK, plutôt que de l'expansion d'une nouvelle sous-population de LT CD4⁺ dépourvus de CXCR4 à leur surface. Ainsi, l'anomalie de recyclage membranaire de CXCR4 et la perte d'expression résultante pourraient contribuer à la recirculation et la différenciation défectueuses des LT CD4⁺ dans la LCI.

Importante d'un point de vue clinique, l'addition *in vitro* d'IL-2 corrige les anomalies intracellulaires et membranaires de CXCR4 dans les LT CD4⁺ de 5 des 6 patients étudiés. De plus, une immunothérapie par l'IL-2 normalise l'expression et la fonction membranaire de CXCR4 tout en augmentant le nombre de LT CD4⁺ circulants chez 3 des 4 patients traités (figure 5). Le seul patient qui ne présente aucune amélioration du taux de LT CD4⁺ lors de la thérapie est celui qui se montre réfractaire aux effets bénéfiques de l'IL-2 sur l'expression de CXCR4, suggérant une association entre la capacité de l'IL-2 à restaurer l'expression membranaire de CXCR4 et son effet thérapeutique sur l'homéostasie des LT CD4⁺. La LCI apparaît donc comme un déficit immunitaire rare associé à un défaut d'expression membranaire de CXCR4, qui pourrait être amélioré par une immunothérapie utilisant l'IL-2.

Cette étude ouvre, pour la première fois, la voie à la compréhension des anomalies moléculaires affectant les LT CD4⁺ et à un traitement de la LCI par immunothérapie. En effet, elle révèle que les LT CD4⁺ circulants de six patients partagent un défaut de recyclage et d'expression membranaire de CXCR4 et une hyposensibilité à CXCL12. Sur la base de ces données, qui méritent d'être étendues à d'autres cohortes, il est tentant de spéculer que l'anomalie de routage intracellulaire, et la perte de fonction résultante, de CXCR4 altère *in vivo* la différenciation et la domiciliation des LT CD4⁺, conduisant à leur déplétion dans le sang et favorisant ainsi l'apparition d'infections opportunistes

sévères. Cependant, plusieurs points restent à éclaircir afin d'établir un lien causal entre la perte de fonction de CXCR4 et la LCI (figure 6). Les bases génétiques et/ou moléculaires qui sous-tendent l'anomalie de trafic intracellulaire et de recyclage de CXCR4 restent à définir. Les conséquences *in vivo* de la perte de fonction de CXCR4 sur l'homéostasie des LT CD4⁺ restent également à déterminer. L'effet bénéfique de l'IL-2 sur l'expression membranaire de CXCR4 et sur le nombre de LT CD4⁺ circulants chez certains patients suggère une implication des cytokines γ -c dans l'étiologie de la LCI. Une possibilité serait qu'un défaut de réponse aux cytokines γ -c conduise à une réduction de l'expression membranaire de CXCR4, ce qui perturberait l'homéostasie des LT CD4⁺. Il reste à déterminer par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) l'IL-2 restaure l'expression de CXCR4 et à individualiser quelle étape de la vie du LT CD4⁺ est normalisée par cette intervention (figure 6).

Conclusions

Cette revue présente comment l'étude de deux déficits immunitaires rares, le SW et la LCI, permet de décrypter le mode de fonctionnement des CKs/RCKs, et en particulier celui de l'axe de signalisation CXCL12/CXCR4. Ces pathologies se caractérisent par des anomalies de CXCR4, qui se distinguent par le fait qu'elles affectent des étapes différentes des voies de signalisation médiées par le RCK. Dans le SW, les patients partagent un défaut d'inactivation de CXCR4 qui se traduit par un gain de fonction du RCK. Dans la LCI, les patients ont tous en commun un défaut de recyclage membranaire de CXCR4 qui conduit à une perte de fonction du RCK. Une hypothèse fédératrice serait que le gain et la perte de fonction de CXCR4, associés respectivement au SW et à la LCI, impactent des stades différents de la vie des leucocytes, conduisant à une lympho-neutropénie ou à une déplétion des LT CD4⁺. Le développement d'un modèle animal du SW permettrait d'élucider les mécanismes pathogènes liant le gain de fonction de CXCR4 aux signes cliniques, mais également d'évaluer l'efficacité et la tolérance de différents inhibiteurs de l'axe CXCL12/CXCR4. À ce titre, l'AMD3100, un antagoniste sélectif de CXCR4 connu pour ses propriétés mobilisatrices (Pusic & Dipersio, 2010), fait figure de proue et pourrait, dans le futur, orienter l'arsenal thérapeutique chez les patients atteints du SW. La situation demeure plus complexe dans la LCI puisque le rôle étiologique de l'anomalie de CXCR4 reste à établir. Un objectif majeur consistera à déterminer les bases moléculaires, et les conséquences *in vivo* sur l'homéostasie des LT CD4⁺, de la perte de fonction de CXCR4. La caractérisation précise de la

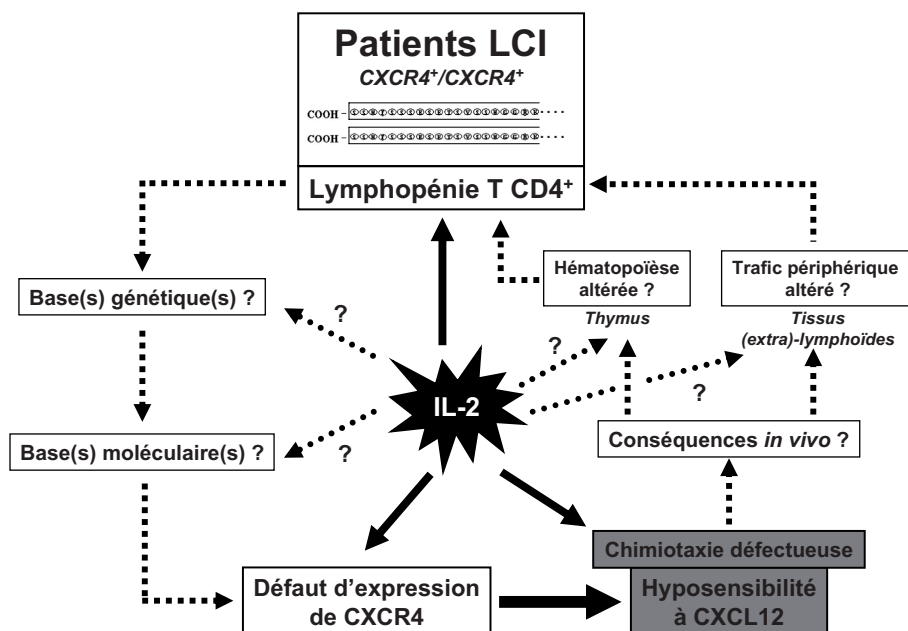


Fig. 6. Mécanisme et impact sur l'homéostasie des LT CD4⁺ de la perte de fonction de CXCR4 dans la LCI. Ce schéma soulève les points à éclaircir (.....) afin d'établir un lien causal entre la perte de fonction de CXCR4 et la LCI, et présente les différentes hypothèses relatives à l'effet bénéfique de l'IL-2.

réponse des LT CD4⁺ aux traitements par l'IL-2 est également requise pour optimiser les approches immunothérapeutiques chez les patients. La modélisation de ces deux pathologies offrira également l'opportunité d'identifier de nouveaux partenaires moléculaires de CXCR4 et de définir leur contribution à la fonction du RCK. Dans le futur, ces candidats pourraient représenter les cibles de nouvelles approches thérapeutiques visant à corriger les défauts immunohématologiques dans le SW et la LCI.

Remerciements. Les auteurs souhaitent remercier l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP, contrat n°07018), l'Université Paris-Sud, l'Union Européenne (FP6, INNOCHEM, contrat n°LSHB-CT-2005-518167), l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, contrat Jeunes Chercheurs) et l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, contrat n°4982) pour leur soutien financier.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cette revue.

Références

Balabanian K., Lagane B., Infantino S., Chow K.Y., Harriague J., Moepps B., Arenzana-Seisdedos F., Thelen M., Bachelierie F., The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 2005a, 280, 35760-35766.

Balabanian K., Lagane B., Pablos J.L., Laurent L., Planchenault T., Verola O., Lebbe C., Kerob D., Dupuy A., Hermine O., Nicolas J.F., Latger-Cannard V., Bensoussan D., Bordigoni P., Baleux F., Le Deist F., Virelizier J.L., Arenzana-Seisdedos F., Bachelierie F., WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*, 2005b, 105, 2449-2457.

- Balabanian K., Levoe A., Klemm L., Lagane B., Hermine O., Harriague J., Baleux F., Arenzana-Seisdedos F., Bachelerie F., Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest*, 2008, 118, 1074–1084.
- Balkwill F., The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14, 171–179.
- Busillo J.M., Benovic J.L., Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768, 952–963.
- Busillo J.M., Armando S., Sengupta R., Meucci O., Bouvier M., Benovic J.L., Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*, 2010, 285, 7805–7817.
- Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.A., HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996, 272, 872–877.
- Gross N., Meier R., Chemokines in neuroectodermal cancers: the crucial growth signal from the soil. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19, 103–110.
- Guimond M., Veenstra R.G., Grindler D.J., Zhang H., Cui Y., Murphy R.D., Kim S.Y., Na R., Hennighausen L., Kurtulus S., Erman B., Matzinger P., Merchant M.S., Mackall C.L., Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 2009, 10, 149–157.
- Gulino A.V., Moratto D., Sozzani S., Cavadini P., Otero K., Tassone L., Imberti L., Pirovano S., Notarangelo L.D., Soresina R., Mazzolari E., Nelson D.L., Notarangelo L.D., Badolato R., Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*, 2004, 104, 444–452.
- Hernandez P.A., Gorlin R.J., Lukens J.N., Taniuchi S., Bohinjec J., Francois F., Klotman M.E., Diaz G.A., Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*, 2003, 34, 70–74.
- Isgro A., Sirianni M.C., Gramiccioni C., Mezzaroma I., Fantauzzi A., Aiuti F., Idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia may be due to decreased bone marrow clonogenic capability. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 136, 379–384.
- Kawai T., Malech H.L., WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol*, 2009, 16, 20–26.
- Kryczek I., Wei S., Keller E., Liu R., Zou W., Stromal-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292, C987–995.
- Lagane B., Chow K.Y., Balabanian K., Levoe A., Harriague J., Planchenault T., Baleux F., Gunera-Saad N., Arenzana-Seisdedos F., Bachelerie F., CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*, 2008, 112, 34–44.
- Lataillade J.J., Domenech J., Le Bousse-Kerdiles M.C., Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)\CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. *Eur Cytokine Netw*, 2004, 15, 177–188.
- Laurence J., Mitra D., Steiner M., Lynch D.H., Siegal F.P., Staiano-Coico L., Apoptotic depletion of CD4⁺ T cells in idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia. *J Clin Invest*, 1996, 97, 672–680.
- Ma Q., Jones D., Borghesani P.R., Segal R.A., Nagasawa T., Kishimoto T., Bronson R.T., Springer T.A., Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 9448–9453.
- Mackay C.R., Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol*, 2008, 9, 988–998.
- Malaspina A., Moir S., Chaitt D.G., Rehm C.A., Kottlilil S., Falloon J., Fauci A.S., Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood*, 2007, 109, 2086–2088.
- Mc Guire P.J., Cunningham-Rundles C., Ochs H., Diaz G.A., Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol*, 2010, 135, 412–421.
- McCormick P.J., Segarra M., Gasperini P., Gulino A.V., Tosato G., Impaired recruitment of Grk6 and beta-Arrestin 2 causes delayed internalization and desensitization of a WHIM syndrome-associated CXCR4 mutant receptor. *PLoS One*, 2009, 4, e8102.
- Moore C.A., Milano S.K., Benovic J.L., Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69, 451–482.
- Nagasawa T., Tachibana K., Kishimoto T., A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol*, 1998, 10, 179–185.
- Netea M.G., Brouwer A.E., Hoogendoorn E.H., Van der Meer J.W., Koolen M., Verweij P.E., Kullberg B.J., Two patients with cryptococcal meningitis and idiopathic CD4 lymphopenia: defective cytokine production and reversal by recombinant interferon-gamma therapy. *Clin Infect Dis*, 2004, 39, e83–87.
- Notarangelo L.D., Badolato R., Leukocyte trafficking in primary immunodeficiencies. *J Leukoc Biol*, 2009, 85, 335–343.
- Onai N., Zhang Y., Yoneyama H., Kitamura T., Ishikawa S., Matsushima K., Impairment of lymphopoiesis and

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

284

Société de Biologie de Paris

- myeloopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine. *Blood*, 2000, 96, 2074–2080.
- Patrusi L., Baldari C.T., Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells. *Immunol Lett*, 2008, 115, 75–82.
- Premont R.T., Gainetdinov R.R., Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69, 511–534.
- Proudfoot A.E., Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2, 106–115.
- Pusic I., Dipersio J.F., Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17, 319–326.
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E., Kucia M., Reza R., Wojakowski W., Ratajczak J., The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, 2006, 20, 1915–1924.
- Raz E., Guidance of primordial germ cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16, 169–173.
- Roger P.M., Bernard-Pomier G., Counillon E., Breittmayer J.P., Bernard A., Dellamonica P., Overexpression of Fas/CD95 and Fas-induced apoptosis in a patient with idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia. *Clin Infect Dis*, 1999, 28, 1012–1016.
- Rubin J.B., Chemokine signaling in cancer: one hump or two? *Semin Cancer Biol*, 2009, 19, 116–122.
- Sawada S., Gowrishankar K., Kitamura R., Suzuki M., Suzuki G., Tahara S., Koito A., Disturbed CD4⁺ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med*, 1998, 187, 1439–1449.
- Scott-Algara D., Balabanian K., Chakrabarti L.A., Mouthon L., Dromer F., Didier C., Arenzana-Seisdedos F., Lortholary O., Idiopathic CD4⁺ T-cell lymphocytopenia is associated with impaired membrane expression of the chemokine receptor CXCR4. *Blood*, 2010, 115, 3708–3717.
- Seligmann M., Aractingi S., Oksenhendler E., Rabian C., Ferchal F., Gonnor G., CD4⁺ lymphocytopenia without HIV in patient with cryptococcal disease. *Lancet*, 1991, 337, 57–58.
- Seligmann M., Autran B., Rabian C., Ferchal F., Olive D., Echard M., Oksenhendler E., Profound and possibly primary “idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia” in a patient with fungal infections. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994, 71, 203–207.
- Siedlar M., Rudzki Z., Strach M., Trzyna E., Pituch-Noworolska A., Blaut-Szlosarczyk A., Bukowska-Strakova K., Lenart M., Grodzicki T., Zembala M., Familial occurrence of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis (WHIM) syndrome. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008, 56, 419–425.
- Smith D.K., Neal J.J., Holmberg S.D., Unexplained opportunistic infections and CD4⁺ T-lymphocytopenia without HIV infection. An investigation of cases in the United States. The Centers for Disease Control Idiopathic CD4⁺ T-lymphocytopenia Task Force. *N Engl J Med*, 1993, 328, 373–379.
- Spira T.J., Jones B.M., Nicholson J.K., Lal R.B., Rowe T., Mawle A.C., Lauter C.B., Shulman J.A., Monson R.A., Idiopathic CD4⁺ T-lymphocytopenia-an analysis of five patients with unexplained opportunistic infections. *N Engl J Med*, 1993, 328, 386–392.
- Takahama Y., Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6, 127–135.
- Takaya J., Fujii Y., Higashino H., Taniuchi S., Nakamura M., Kaneko K., A case of WHIM syndrome associated with diabetes and hypothyroidism. *Pediatr Diabetes*, 2009, 10, 484–486.
- Tassone L., Notarangelo L.D., Bonomi V., Savoldi G., Sensi A., Soresina A., Smith C.I., Porta F., Plebani A., Notarangelo L.D., Badolato R., Clinical and genetic diagnosis of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome in 10 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123, 1170–1173.
- Trojan T., Collins R., Khan D.A., Safety and efficacy of treatment using interleukin-2 in a patient with idiopathic CD4(+) lymphopenia and Mycobacterium avium-intracellulare. *Clin Exp Immunol*, 2009, 156, 440–445.
- Tsutsumi H., Tanaka T., Ohashi N., Masuno H., Tamamura H., Hiramatsu K., Araki T., Ueda S., Oishi S., Fujii N., Therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multifunctional agents. *Biopolymers*, 2007, 88, 279–289.
- Walker U.A., Warnatz K., Idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Curr Opin Rheumatol*, 2006, 18, 389–395.
- Warnatz K., Draeger R., Schlesier M., Peter H.H., Successful IL-2 therapy for relapsing herpes zoster infection in a patient with idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia. *Immunobiology*, 2000, 202, 204–211.
- Yu D., Rao S., Tsai L.M., Lee S.K., He Y., Sutcliffe E.L., Srivastava M., Linterman M., Zheng L., Simpson N., Ellyard J.I., Parish I.A., Ma C.S., Li Q.J., Parish C.R., Mackay C.R., Vimesa C.G., The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*, 2009, 31, 457–468.
- Zonios D.I., Falloon J., Bennett J.E., Shaw P.A., Chaitt D., Baseler M.W., Adelsberger J.W., Metcalf J.A., Polis M.A., Kovacs S.J., Kovacs J.A., Davey R.T., Lane H.C., Masur H., Sereti I., Idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood*, 2008, 112, 287–294.
- Zuelzer W.W., “Myelokathexis”-a New Form of Chronic Granulocytopenia. Report of a Case. *N Engl J Med*, 1964, 270, 699–704.

II- Curriculum Vitae

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Vincent BIAJOUX

Doctorant 4^e Année (Immunologie), ED425 – Université Paris-Sud XI
Né le 6 décembre 1984 à Clamart (92) - Célibataire
Adresse : 2, rue Ernest Lavisse, 78280 GUYANCOURT
Courriel : vincent.biajoux@u-psud.fr - Contact : 06 76 45 19 01

Diplômes

Doctorat de l'Université Paris-Sud XI : Immunologie Ecole Doctorale 425 : Innovation thérapeutique « Du fondamental à l'appliqué » Université Paris-Sud XI (91)	Septembre 2013
Master 2 Professionnel : Droit des Biotechnologies / Santé Université de Versailles – Saint Quentin (78)	Septembre 2009
Master 2 Recherche : Cancérologie / Pharmacologie et Thérapeutique Université Paris-Sud XI (91) / Ecole Normale Supérieure de Cachan (92)	Juin 2008
Maîtrise : Biologie et Thérapies Innovantes des Grandes Fonctions Université Paris-Sud XI (91)	Septembre 2007
Licence : Biologie / Chimie Université Paris-Sud XI (91)	Juin 2006
Diplôme d'Etudes Universitaires générales : Sciences de la matière Université Paris-Sud XI (91)	Juin 2005
Baccalauréat général : Scientifique Lycée de Villaroy (78)	Juin 2003

Mémoires de Stage

INSERM UMR-S 996, Clamart Bases moléculaires et génétiques des anomalies de CXCR4 dans le syndrome WHIM. Direction : Dr. Karl BALABANIAN	Octobre 2009 – Septembre 2013
Cabinet d'Avocats Di Vizio, Paris XIV^e Données acquises de la science et contentieux ordinal Direction : Me. Fabrice DI VIZIO	Juillet 2009 – Aout 2009
UPRES EA 3535, IGR, Villejuif Inhibition du VEGF-A et VEGF- C par ARN-interférence dans un modèle de neuroblastome. Direction : Dr. Jochen ROESSLER	Octobre 2007 – Juin 2008
CHU Ste Justine, Montréal, Qc. (CA) Caractérisation d'un modèle murin d'hépatite auto-immune Direction : Dr. Idriss DJILALI-SAIAH	Mai 2007 – Septembre 2007

Enseignement

Monitorat d'hématologie, 2^e et 3^e Années de pharmacie (192h) Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud XI Direction : Dr. Elsa BIANCHINI	Octobre 2009 – Septembre 2012
--	--------------------------------------

Implication Universitaire

Elu au conseil scientifique de l'Université Paris-Sud XI Collège G – Titulaire	Mars 2012
Séminaire LERU « Research Integrity », Oxford (UK) Participation mandatée par le Conseil Scientifique pour la League of European Research Universities. Présentation devant le Conseil Scientifique le 21/01/2013	Octobre 2012
Nomination au Collège des Ecoles doctorales Nomination temporaire en tant que membre étudiant au Collège des Ecoles Doctorales de l'Université Paris-Sud XI	Mars 2013

Distinction

Prix ImmunID-SFI (Société Française d'Immunologie) <i>Impaired expression of CXCL12 receptors in B cells from patients with Systemic Lupus Erythematosus.</i> Biajoux V. , Bignon A., Martinez V., Thelen M., Emilie D., Llorente L., Balabanian K.	Novembre 2011
--	----------------------

Impact d'un gain de fonction de *Cxcr4* sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes

Publications

Fine-tuning CXCR4 desensitization in lymphopoiesis intrinsically regulates lymphocyte homeostasis and humoral immunity. (En préparation – J. Exp. Med.)

Biajoux V, Freitas C, Sacquin A, Hemon P, Gaudin F, Fazilleau N, Balabanian K.

S1PR5 is pivotal for the homeostasis of patrolling monocytes (Accepté)

Debien E*, Mayol K*, Biajoux V, Daussy C, Gomez De Agüero M, Taillardet M, Dagany N, Brinza L, Henry T, Dubois B, Kaiserlian D, Marvel J, Balabanian K, Walzer T.
Eur J Immunol. 2013 Mar 20;ej.201343312

Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizo patients with systemic lupus erythematosus.

Biajoux V, Bignon A, Freitas C, Martinez V, Thelen M, Lima G, Jakez-Ocampo J, Emilie D, Llorente L, Balabanian K.
J Transl Med. 2012 Dec 18;10:251.

Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice.

Balabanian K, Biajoux V*, Brotin E*, Bouchet-Delbos L*, Lainey E, Fenneteau O, Bonnet D, Fiette L, Emilie D, Bachelier F.
Blood. 2012 Jun 14;119(24):5722-30.

Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking.

Mayol K, Biajoux V, Marvel J, Balabanian K, Walzer T.
Blood. 2011 Nov 3;118(18):4863-71.

CXCR4, une cible thérapeutique dans certains déficits immunitaires rares ? (Revue)

Bignon A*, Biajoux V*, Bouchet-Delbos L, Emilie D, Lortholary O, Balabanian K.
Med Sci (Paris). 2011 Apr;27(4):391-7.

Anomalies de l'axe de signalisation CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 dans le syndrome WHIM et la lymphopénie T CD4+ idiopathique (Revue)

Biajoux V, Bignon A, Bouchet-Delbos L, Emilie D, Balabanian K.
Biol Aujourd'hui. 2010;204(4):273-84.

Valorisation

Communication orale : 16^e Colloque Cytokines et Chimiokines, Le Croisic

Mai 2013

Communication orale : E-Rare : WHIMTherief, Brescia (IT)

Mai 2013

Fine-tuning CXCR4 desensitization in lymphopoiesis intrinsically regulates lymphocyte homeostasis and humoral immunity.

Communication orale : Annual meeting of the GDR-3545 : RCPG-Physio-Med, Paris

Octobre 2012

Communication orale : Journées de l'école doctorale 425, Chatenay-Malabry

Juin 2012

Poster : Gordon Research Conference "Chemotactic Cytokines", Il Ciocco (IT)

Mai 2012

Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice.

Brève: Gazette de la Société française d'Immunologie n°125

Mars 2012

Anomalie de l'expression des récepteurs de la chimiokine CXCL12 dans les cellules B de patients atteints de lupus érythémateux disséminé.

Bignon A, Biajoux V, Balabanian K.

Communication orale : Journée LabEx LERMIT T2, Orsay

Février 2012

Hyperactivate CXCR4 in a WHIM syndrome model : Stronger but not better.

Biajoux V.

Poster : Congrès annuel de la société française d'Immunologie, Montpellier

Novembre 2011

Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking.

Financements Obtenus

Subvention de fin de thèse, Fondation pour la recherche médicale

Nov. 2012 – Sept. 2013

Fellowship INNOCHEM

Juin 2010

Gordon Research Conference "Chemotactic Cytokines", Il Ciocco (IT)

INNOCHEM Training Course "From Scientific Discovery to Therapeutic Interventions: Trials and Tribulations", Sienna (IT)

Allocation doctorale (MESR), Université Paris-Sud XI

Oct. 2009 – Sept. 2012

*Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation
périphérique des lymphocytes*

◆ Impact d'un gain de fonction de Cxcr4 sur le développement et la compartimentalisation périphérique des lymphocytes.

Le syndrome WHIM (SW) est un déficit immuno-hématologique rare causé principalement par des mutations autosomales dominantes du gène *CXCR4* qui entraînent une troncation du domaine C-terminal (C-Ter) du récepteur. Les formes mutantes de *CXCR4* associées au SW génèrent des altérations de la désensibilisation et de l'internalisation du récepteur en réponse à CXCL12, qui se traduisent par une hypersensibilité à l'action chimiotactique du ligand. *CXCR4* est un récepteur de chimiokine exprimé sur les leucocytes dont le rôle dans l'hématopoïèse et le trafic leucocytaire à l'état basal suggère que la lymphonéutropénie des patients atteints du SW est due à des défauts de production et/ou de domiciliation périphérique des leucocytes causés par le gain de fonction de *CXCR4*. Néanmoins, la validation de cette hypothèse est difficile chez les patients. En générant une souche de souris (*Cxcr4^{+/1013}*), porteuse d'une mutation rapportée chez une famille de patients par une stratégie de *knock-in*, nous avons mis en évidence le rôle du domaine C-Ter de *Cxcr4* dans le développement, la domiciliation périphérique des lymphocytes et l'immunité adaptative à médiation humorale.

Les principaux résultats issus de notre travail, obtenus en combinant des approches biochimiques, fonctionnelles, de reconstitution de l'hématopoïèse par compétition, de transferts adoptifs et d'injection d'anticorps anti-CD45 *in vivo*, sont : 1) La mutation *Cxcr4¹⁰¹³* tronquant le domaine C-Ter se comporte différemment en terme de signalisation, selon qu'elle soit présente à l'état hétérozygote ou homozygote, et perturbe respectivement les transitions double-négatif (DN) 2-DN3 et proB-preB de la lymphopoïèse dans le thymus et la moelle osseuse (MO). Au contraire, elle ne génère pas d'effets sur le développement des cellules NK et la myélopoïèse ; 2) La lymphopénie qui touche les lymphocytes B (LB) et T (LT) est un processus intrinsèque aux cellules porteuses de la mutation *Cxcr4¹⁰¹³* et suit un modèle allèle-dose-dépendant ; 3) Le défaut de désensibilisation de *Cxcr4¹⁰¹³* empêche le relargage des lymphocytes NK et B immatures de la MO et celui des LB et LT matures des ganglions lymphatiques dans le sang. A l'inverse, le gain de fonction exacerbe la migration des LB recirculants et LT matures et leur rétention dans le parenchyme médullaire ; et 4) malgré l'absence de follicules primaires dans les ganglions lymphatiques, les souris mutantes sont capables de mettre en place une réponse immunitaire humorale efficace et spécifique d'un antigène T-dépendant, comme en témoigne l'augmentation des LB du centre germinatif et des plasmocytes ayant effectué une commutation isotypique. En conclusion, nous démontrons que la signalisation fine médiée par *Cxcr4* est nécessaire pour le développement, la compartimentalisation périphérique et la fonction des lymphocytes.

◆ Impact of a gain-of-Cxcr4-function in lymphocyte development and peripheral trafficking.

The WHIM Syndrome (WS) is a rare combined immuno-hematological disorder caused by inherited heterozygous autosomal dominant mutations in *CXCR4*, which result in most cases in the distal truncation of the receptor's Carboxyl-terminal tail (C-Tail). Mutants of *CXCR4* associated with WS display impaired desensitization and internalization of the receptor upon CXCL12 exposure, leading to enhanced migratory response. Because *CXCR4* is expressed on leukocytes, we hypothesized that circulating pan-leukopenia could arise from altered *CXCR4*-mediated signalling that would skew tissue distribution and differentiation of leukocytes. This assumption was obviously difficult to address in patients. By generating a knock-in mouse strain (*Cxcr4^{+/1013}*) that harbors a WS-linked gain-of-*Cxcr4*-function mutation, we establish that the C-tail domain in *Cxcr4*-mediated signalling is a pivotal regulator of lymphocyte development, peripheral trafficking and humoral immunity.

The essential findings of our work, obtained by combining biochemical, bone marrow (BM)-mixed chimeras, *in vivo* labelling, adoptive co-transfers and functional approaches, are: 1) the C-tail truncating *Cxcr4¹⁰¹³* mutation caused differential signalling capacities depending on its heterozygous versus homozygous status and inhibited double-negative (DN) 2-to-DN3 and pro-B-to-pre-B developmental transitions during lymphopoiesis. In contrast, it had no effect on NK lymphopoiesis and granulopoiesis; 2) the resulting circulating B and T lymphopenia was due to hematopoietic cell-intrinsic defects and followed a mutated allele dose-dependent pattern; 3) impaired *Cxcr4¹⁰¹³* desensitization prevented the release of immature BM NK and B cells and mature lymph node (LN) B and T lymphocytes into the blood. Conversely, it forced homing and retention of mature recirculating B and T cells in the BM parenchyma; and 4) despite the absence of primary B-cell follicles in LNs, mutant mice produced efficient humoral responses upon immunization as illustrated by increased antigen-specific germinal center B cells and isotype-switched plasma cells. Collectively, our findings demonstrate that fine-tuning of *Cxcr4* signal strength is required for optimal trafficking, egress and fitness of lymphocytes.

◆ Mots-clés : Chimiokine ; CXCL12; CXCR4 ; Lymphocyte ; Signalisation ; Syndrome WHIM.

◆ Laboratoire de rattachement :

INSERM UMR_S996

« CYTOKINES, CHIMIOKINES ET IMMUNOPATHOLOGIE »

32, rue des Carnets

92140 CLAMART

◆ ECOLE DOCTORALE 425 « INNOVATION THERAPEUTIQUE »

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR « FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex