

## PRIX POSTER

## SFI/IMMUNID

Lors de son dernier congrès annuel 2011 à Montpellier, la Société Française d'Immunologie et la société Immunid ont décerné trois «Prix Meilleur Poster» d'un montant de 500 € chacun, à **Grazia Abou-Ezzi**, Inserm U567, Nice (*Rôle immunomodulateur des ostéoclastes*), **Olivia Briceno** - Inserm U945, Paris (*La co-culture accéléré de cellules dendritiques : application à l'étude de cellules progénitrices T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène*) et **Alexandre Bignon**, Inserm UMRS-996, Clamart (*Anomalie de l'expression des récepteurs de la chimiokine CXCL12 dans les cellules B de patients atteints de Lupus Erythémateux Disséminé*).

## ROLE IMMUNOMODULATEUR DES OSTEOCLASTES

**Grazia Abou-Ezzi**  
**Claudine Blin-Wakkach**

Inserm U576, Université de Nice  
Sophia-Antipolis  
Nice

grazia@unice.fr  
blin@unice.fr

**D**epuis maintenant plus de 10 ans, de nombreuses études ont montré l'importance des interactions entre système immunitaire et osseux. Ces interactions impliquent de nombreux types cellulaires et leur conséquence sur le remodelage osseux ou les réponses immunitaires sont très importantes.

Le remodelage osseux est un processus très dynamique au cours duquel l'intégralité de notre squelette est remplacée tous les 10 ans. Il résulte de l'action couplée des ostéoblastes qui produisent la matrice osseuse et des ostéoclastes (OCLs) qui la résorbent. Mais l'équilibre de ce remodelage est perturbé dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques dans lesquelles une perte osseuse due à une résorption osseuse excessive est observée. Les OCLs sont des cellules hématopoïétiques dérivés du lignage monocytaire qui se différencient sous l'influence de deux cytokines essentielles, le Receptor Activator of NFκB ligand (RANK-L) et le Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF). Kong et al. ont montré qu'en condition inflammatoire, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés stimulent la différenciation des pré-OCLs en OCLs (1). De plus, de nombreuses études ont démontré que les cytokines inflammatoires, en particulier celles produites par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> modulent l'ostéoclastogenèse. Ces cytokines peuvent avoir un effet stimulateur (TNF-α, IL-6, IL-17...) ou inhibiteur (IFN-γ, IL-4, IL-10, GM-CSF...) de l'ostéoclastogenèse. Réciproquement, les cellules osseuses et en particulier les ostéoclastes peuvent également influencer sur la différenciation et la réponse des cellules immunitaires.

**L'ostéoclaste a des effets plus importants que la dégradation de la matrice osseuse**

Les anomalies (augmentation ou diminution) de l'activité des OCLs sont très souvent associées à des anomalies du système immunitaire. Ainsi, de nombreux modèles d'ostéopétrose caractérisés par une perte d'activité des OCLs présentent une réduction de la lymphopoïèse B. Notre équipe a montré que cette réduction était due à une altération de la niche médullaire des progéniteurs B qui défavorise la domiciliation de ces cellules dans la moelle osseuse (2).



Les ostéoclastes participent également à la régulation des niches des cellules souches hématopoïétiques (HSCs). La réponse des HSCs aux signaux de stress et de danger est médiée par des changements de l'activité des OCLs. Les OCLs activés produisent des enzymes protéolytiques qui clivent les facteurs impliqués dans les interactions entre les cellules souches et leur niche (3). L'inhibition des OCLs conduit également à mobilisation des cellules en modulant les cellules mésenchymateuses qui forment leurs niches (4). Très récemment, nous avons aussi montré que les OCLs contrôlent la formation de la niche des HSCs en induisant la différenciation de la niche endostéale nécessaire à la domiciliation initiale des HSCs vers la moelle osseuse (5).

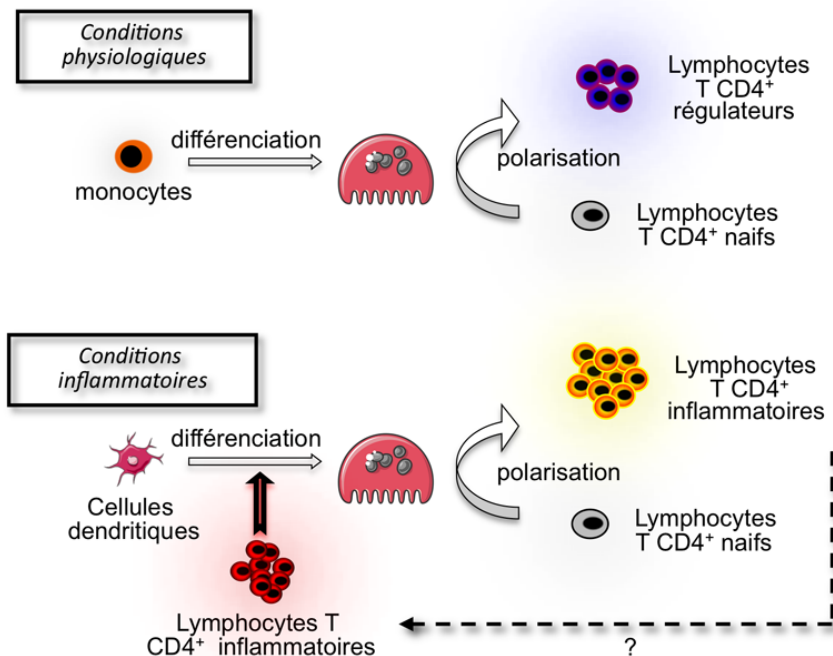
Plus récemment, il a été suggéré que les OCLs pourraient également avoir une fonction immunosuppressive. Kiesel et al ont montré que les OCLs obtenus à partir de moelle osseuse de souris sont capables de cross-présenter des antigènes et d'induire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>(6). Li et al ont montré *in vitro* que les OCLs générés à partir de monocytes sanguins humains sont

capables d'activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> alloréactifs qui produisent principalement de l'IL-10 (7). De même, *in vitro*, il a été montré que les OCLs dérivés de monocytes humains attirent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, inhibent leur prolifération et leur production de TNF-α et IFN-γ, traduisant un effet immunosuppresseur (8). Notre équipe a également montré que les OCLs issus de monocytes de souris expriment le complexe CMH-II et les molécules de costimulation CD80 et CD86 et qu'ils présentent des antigènes. Nous avons également montré en système antigène spécifique, qu'ils induisent l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et leur polarisation en lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup> et immunosuppresseurs *in vitro* (9). De l'ensemble de ces travaux, il apparaît donc que la fonction de l'OCL ne se limite pas à la résorption osseuse mais implique également une immunomodulation.

### De la cellule dendritique à l'OCL, la fonction se conserve

A ces nouvelles fonctions immunomodulatrices de l'OCL s'ajoute un autre niveau de complexité, des

origines multiples. Rivollier et al. ont montré que les cellules dendritiques (DCs) dérivées de monocytes humains se différencient *in vitro* en OCLs fonctionnels en présence de RANK-L et de M-CSF. Cette différenciation est bien plus efficace que celle obtenue directement à partir des monocytes (10). De plus, elle augmente considérablement en présence de liquide synovial de patients arthritiques, alors que la différenciation des OCLs à partir des monocytes y est beaucoup moins sensible. Notre équipe a démontré que cette différenciation se produit également *in vivo* et nécessite la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inflammatoires induisant une forte expression de RANK-L dans la moelle osseuse (11). Cette voie de différenciation semble donc caractéristique d'un environnement inflammatoire. Ces observations ont conduit notre équipe à s'interroger sur la capacité de ces OCLs dérivés des cellules dendritiques à interagir avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Nos résultats montrent qu'ils expriment également le complexe CMH-II et les molécules de costimulation CD80 et CD86 et sont capables de présenter des antigènes (9). En revanche, nous avons montré qu'ils activent les lymphocytes T façon beaucoup plus efficace que les OCLs dérivés des monocytes et cette activation conduit à une polarisation, non pas en lymphocytes Treg, mais en lymphocytes T inflammatoires producteurs de TNF-α. Cette différence de polarisation entre les 2 types d'OCLs peut s'expliquer par un profil d'expression cytokinique distinct, majoritairement immunosuppresseur pour les OCLs dérivés des monocytes et majoritairement inflammatoire pour ceux dérivés des DCs (9). Les OCLs apparaissent donc bien comme des cellules immunomodulatrices dont l'effet dépend de leur origine (Figure 1).



*L'ostéoclaste module la balance entre inflammation et immunosuppression*  
 Les OCLs différenciés à partir des monocytes (MN-OCLs) induisent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs exprimant Foxp3<sup>+</sup> dans des conditions physiologiques. Dans des conditions inflammatoires, la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inflammatoires est nécessaire à la différenciation des cellules dendritiques en OCLs (DC-OCLs). Nos résultats montrent que ces DC-OCLs induisent à leur tour des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inflammatoires. Il est donc possible que cette voie de différenciation conduise à une boucle d'amplification entre inflammation et différenciation des OCLs.

### Conclusions

Les résultats obtenus au cours des dernières années révèlent que la fonction des OCLs est bien plus large que la simple fonction de résorption de la matrice osseuse. Les OCLs modulent la différenciation et la mobilisation des cellules immunitaires et de leurs précurseurs *in vivo* et l'orientation de la réponse immunitaire, même si cette dernière fonction reste à démontrer *in vivo*.

Leur effet sur la mobilisation des cellules immunitaires et de leurs précurseurs est lié au phénomène de couplage existant entre les OCLs

et les ostéoblastes/précurseurs méenchymateux qui composent les niches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (2,5) et indique également que le remodelage osseux permet le remodelage de ces niches afin d'en libérer les cellules immunitaires (12).

La fonction immunosuppressive des OCLs dérivés des monocytes est physiologiquement très intéressante. En effet, comme suggéré par Kiesel et al, cette fonction pourrait participer à l'établissement d'une tolérance vis-à-vis de ces peptides du soi qui sont générés en permanence par la dégradation de la matrice osseuse par les OCLs, évitant ainsi les réactions autoimmunes vis-à-vis de ces produits de dégradation (6).

En conditions inflammatoires, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que les DCs contribuent efficacement à l'ostéoclastogénèse. L'effet immunogénique des OCLs générés à partir des DCs dans ces conditions pourrait entraîner des réactions autoimmunes vis-à-vis des antigènes du soi. De plus, étant donné l'effet ostéoclastogénique des lymphocytes T de la moelle osseuse, ces réactions pourraient contribuer au cercle vicieux existant entre inflammation chronique et destruction osseuse.

L'ensemble de ces résultats ouvre de nouvelles perspectives sur les interactions ostéoimmunologiques dans lesquelles l'OCL apparaît comme un acteur clé.

#### Remerciements

Ce travail a été soutenu par la fondation Arthritis.

#### REFERENCES

1. Kong YY et al 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304-309.
2. Mansour A et al 2011. Osteoclast activity modulates B cell development in the bone marrow. *Cell Research* 21:1102-1115.
3. Kollet O et al 2006. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12:657-664.
4. Lympéri S et al 2011. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers *in vivo*. *Blood* 117:1540-1549.
5. Mansour A et al 2011. Osteoclasts control the formation of the hematopoietic stem cell niche in the bone marrow. *J Exp Med*. Under revision
6. Kiesel JR et al 2009. Cross-presentation by osteoclasts induces FoxP3 in CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Immunology* 182:5477-5487.
7. Li H et al 2010. Crosstalk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 116:1007-1015.
8. Grassi F et al 2011. T cell suppression by osteoclasts *in vitro*. *J Cell Physiol* 126:982-990.
9. Abou Ezzi G et al. Osteoclasts modulate the balance between immunosuppression and inflammation through interactions with CD4<sup>+</sup> T cells. Submitted
10. Rivollier, A et al 2004. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* 104:4029-4037.
11. Wakkach A et al 2008. Bone marrow microenvironment controls the *in vivo* differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* 112:5074-5083.
12. Kollet O et al 2007. The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization. *Annu Rev Immunol* 25:51-69.

## PROTOCOLE DE CO-CULTURE ACCELEREE DE CELLULES DENDRITIQUES : APPLICATION A L'ETUDE DES CELLULES PRECURSEURS T CD8<sup>+</sup> SPECIFIQUES D'ANTIGENE

**Olivia Briceño**  
**Candela Iglesias**  
**Victor Appay**

Inserm UMR 945, Université Pierre et Marie Curie Paris 6  
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

[victor.appay@upmc.fr](mailto:victor.appay@upmc.fr)

Un aspect important dans l'étude de l'immunité adaptative est la compréhension du processus par lequel les réponses des cellules T spécifiques sont générées à partir de précurseurs T naïfs. Les cellules T CD8<sup>+</sup> matures circulantes qui n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique sont désignées comme des cellules naïves. Après activation de leurs récepteurs (TCR), par un antigène spécifique associé au complexe major d'histocompatibilité (CMH) des cellules dendritiques, les cellules T CD8<sup>+</sup> subissent une expansion et une différenciation



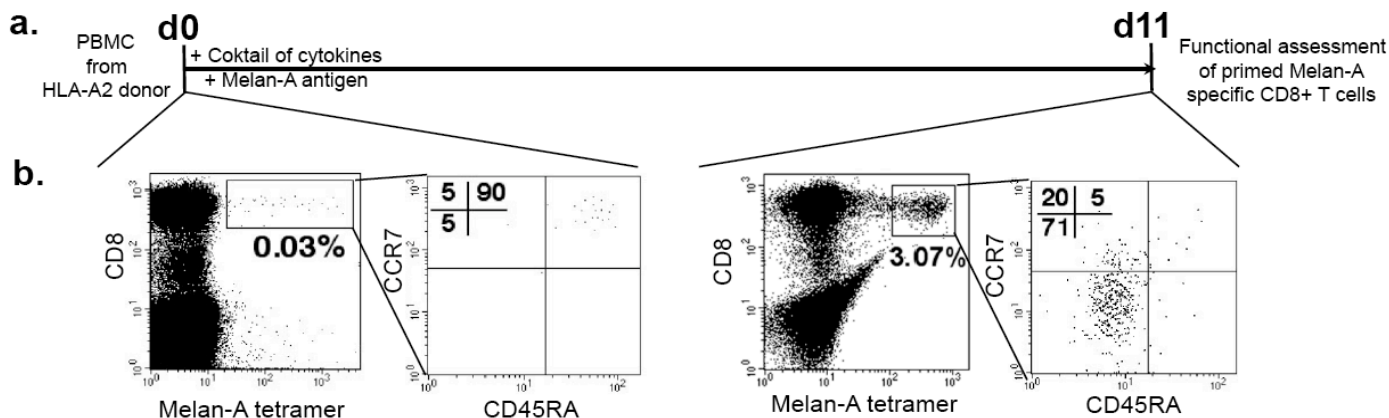


Figure 1 Induction *in vitro* de réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques de Melan-A à partir de précurseurs T naïfs dans le sang de donneurs HLA-A2

a. Représentation schématique de la procédure méthodologique (de jour 0 à 11). b. Marquage CD8 et tétramère montrant la fréquence de cellules spécifiques de Melan-A chez un donneur sain à jour 0 (caractérisées par un phénotype CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> naïf) et au jour 11 de culture (caractérisées par un phénotype CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> mémoire).

en cellules effectrices. Pendant cette différenciation, les cellules T CD8<sup>+</sup> subissent des changements dans leurs marqueurs de surface et leurs capacités fonctionnelles (1).

La protection contre les maladies par les cellules spécifiques T CD8<sup>+</sup> dépend de leur activation appropriée, ce qui correspond à une augmentation de la fréquence des cellules T, une différenciation en cellules effectrices et mémoires et au développement des fonctions des lymphocytes T. Plusieurs propriétés des cellules T ont été établies comme corrélats d'efficacité contre les maladies infectieuses, l'un d'eux pourrait être la fréquence des précurseurs naïfs T CD8<sup>+</sup> spécifique d'un antigène (2). Dans des modèles murins, il a ainsi été démontré que cette fréquence est prédictive de la magnitude des réponses immunitaires (3). Plusieurs méthodes sont disponibles pour détecter les cellules T spécifique d'un épitope (4), et incluent leur détection par cytométrie de flux grâce aux tétramères, une culture *in vitro* des cellules avec un antigène spécifique suivi par la mesure de la prolifération cellulaire, la production de cytokines ou l'induction de marqueurs d'activation. Mais, le très faible nombre de précurseurs naïfs T spécifique d'un antigène représente une difficulté pour les étudier particulièrement chez l'homme.

A partir d'un système expérimental simple *in vitro* de «co-culture accélérée de cellules dendritiques» développé par l'équipe de Roberto Mallone (Inserm U986, Paris) à pour mesurer les faibles réponses T mémoires (5), nous avons récemment établi qu'il est possible d'induire des populations de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un

antigène à partir de précurseurs naïfs. Nous avons ainsi développé un protocole efficace pour mesurer la capacité des cellules naïves T CD8<sup>+</sup> à se différencier et à proliférer après stimulation avec un antigène spécifique chez l'homme. Cet essai est basé sur le fait que les donneurs sains HLA-A2 ont une fréquence particulièrement élevée de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifique de l'antigène Melan-A / MART-1 (ou mélanocyte différenciation antigène) qui appartiennent à la population naïve, ce qui indique probablement que la sélection thymique a généré un nombre élevé de précurseurs à travers la reconnaissance de peptides inconnus cross-reactifs avec Melan-A (6). Melan-A est utilisé ici comme un antigène modèle.

Quelques millions de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains HLA-A2 positifs (identifiés en cytométrie de flux à l'aide d'anticorps anti-HLA-A2) sont mis en culture avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 24 heures, puis d'un cocktail d'agents maturants, ainsi que le peptide Melan-A. Après 10 jours de culture, nous pouvons alors quantifier la population cellulaire CD8<sup>+</sup> spécifique de l'antigène Melan-A à l'aide d'un tétramère fluorescent, mesurer les cellules de haute avidité en utilisant des tétramères CD8 nuls (c.a.d. tétramère muté qui annule la reconnaissance du CD8 sans affecter l'intégrité des interactions avec le TCR) (7), ainsi que caractériser leur phénotype (c.a.d. expression de CD45RA et CCR7) et leur profil polyfonctionnel (c.a.d. production de cytokines effectrices) par cytométrie de flux (voir figure). Ce type d'analyse permet d'étayer les données fonctionnelles des cellules naïves après stimulation.

Ce protocole *in vitro* représente un système particulièrement intéressant pour étudier les attributs qualitatifs et quantitatifs des précurseurs naïfs T CD8<sup>+</sup> après stimulation dans un contexte de spécificité antigénique, et donc d'étudier les facteurs pouvant altérer l'établissement d'une réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> chez l'homme, ceci dans un court laps de temps et à partir d'un petit échantillon.

## REFERENCES

1. Stemberger C et al 2007. A single naive CD8<sup>+</sup> T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets, *Immunity* 27:985-997.
2. Ford M et al 2007. Antigen-specific precursor frequency impacts T cell proliferation, differentiation and requirements for costimulation. *J Exp Med* 204:299-309.
3. Obar J et al 2008. Endogenous naive CD8<sup>+</sup> T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28:859-869.
4. Moon J et al 2009. Tracking epitope-specific T cells, *Nature Protocols* 4:565-581.
5. Martinuzzi E et al 2010. ACDCs enhance human antigen-specific T-cell responses, *Blood* 118:2128-2137
6. Voelter V et al 2008. Characterization of Melan-A reactive memory CD8<sup>+</sup> T cells in a healthy donor. *Int Immunol* 20:1087-1096.
7. Laugel B et al 2007. Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties, *J Biol Chem* 282:23799-23810.



# ANOMALIE DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS DE LA CHIMIOKINE CXCL12 DANS LES CELLULES B DE PATIENTS ATTEINTS DE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ

Alexandre Bignon  
Vincent Biajoux  
Karl Balabanian

Université Paris-Sud, UMR-S 996  
Inserm, LERMIT, Clamart.

alexandre.bignon@u-psud.fr  
vincent.biajoux@u-psud.fr  
karl.balabanian@u-psud.fr

Le Lupus Erythémateux Disséminé (LED) est une pathologie auto-immune, chronique, inflammatoire et systémique, qui se caractérise sur un plan immunitaire notamment par une hyperactivité des compartiments lymphocytaires T (LT) et B (LB) et une production d'auto-anticorps (Ac) dirigés contre les différents composants nucléaires. Ce processus auto-immun résulterait d'une rupture de tolérance à la fois centrale et périphérique aux antigènes nucléaires, entraînant la formation de complexes immuns circulants et leur dépôt dans divers organes tels que la peau et le rein. Le LED présente un tableau clinique complexe et hétérogène, avec de multiples atteintes viscérales menant au décès des patients en particulier lorsque l'atteinte rénale (glomérulonéphrite) est confirmée (1). Déterminer les facteurs impliqués dans la domiciliation tissulaire et la persistance des LB auto-réactifs constitue un enjeu majeur dans le décryptage de la physiopathologie du LED. Dans cette optique, les chimiokines (CKs) et leurs récepteurs (RCKs) constituent une piste à explorer. Diverses études ont impliqué ce système dans les mécanismes inflammatoires et la progression de maladies auto-immunes dépendantes des LB, incluant le LED et la Polyarthrite Rhumatoïde (2). Nos travaux se sont focalisés sur la CK  $\alpha$  CXC Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) qui régule, de concert avec son principal RCK CXCR4, l'ontogénie, la différenciation et la domiciliation des LB à l'état basal et dans différentes conditions pathologiques. Les activités de cet axe dans l'homéostasie des LB auto-réactifs restent encore à définir dans le LED. En effet, alors qu'une augmentation de la détection de CXCL12 est consensuellement rapportée dans les reins et le sérum des patients, l'expression de CXCR4 à la surface des LB circulants est largement controversée, étant décrite comme altérée ou non selon les travaux (3). Jusqu'en 2005, CXCL12 et CXCR4 étaient supposés maintenir une relation unique. Notre découverte d'un second RCK pour CXCL12, à savoir RDC1 que nous avons rebaptisé CXCR7, contredit ce postulat et implique de déterminer les contributions respectives des 2 RCKs dans les activités homéostatiques et pathologiques de CXCL12 (4). Bien que la signature moléculaire liée à l'activation de CXCR7 soit encore débattue, son

expression semble régulée durant la différenciation des LB et corrélée avec leur capacité à sécréter des Ac. A ce jour, aucune étude n'a exploré CXCR7 dans le contexte du LED. Notre objectif a été d'évaluer l'expression et l'activité de CXCR4 et de CXCR7 dans les LB circulants de patients lupiques.

## Perte d'expression membranaire de CXCR4 et de CXCR7

Notre étude a porté sur des échantillons sanguins issus d'une cohorte de 41 patients d'origine mexicaine et de 24 donneurs sains (collaboration avec le Dr. Luis Llorente, Département d'Immunologie et de Rhumatologie, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico). Nos analyses menées par cytométrie en flux rapportent des perturbations majeures du compartiment de LB chez les patients, à savoir une lymphopénie B touchant préférentiellement les cellules naïves et une augmentation significative de la fréquence des plasmocytes (PC). La fraction des PC corrèle positivement avec l'activité de la maladie lupique, confirmant en cela des études antérieures (5). S'appuyant sur cette cohorte cliniquement bien définie, nous avons ensuite évalué si l'altération de la distribution sanguine des LB était associée à des dérégulations de CXCR4 et/ou de CXCR7. En premier lieu, nous avons observé par PCR quantitative en temps réel une diminution des ARNm codant pour CXCR4 ou CXCR7 dans les leucocytes de patients. Nous avons ensuite recherché si de telles anomalies transcriptionnelles se reflétaient au niveau protéique, et précisément dans les LB. Dans ce but, nous avons réalisé une analyse globale par cytométrie en flux de la compartimentalisation membranaire et intracellulaire des deux RCKs de CXCL12 dans les sous-populations de LB suivantes : naïves, mémoires et PC. Nos données révèlent une profonde diminution de l'expression de CXCR4, et dans une moindre mesure de celle de CXCR7, à la surface des sous-populations de LB chez les patients lupiques.

## Localisation intracellulaire anormale de CXCR4 et de CXCR7

Le paradigme moléculaire des RCKs, qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G, indique que, suite à



la liaison du ligand, les récepteurs subissent une désensibilisation (ou découplage des protéines G), une internalisation et un routage intracellulaire qui les oriente soit vers une dégradation dans les compartiments lysosomiaux ou bien vers un recyclage à la membrane plasmique. C'est pourquoi nous avons testé la possibilité que l'anomalie d'expression membranaire de CXCR4 et de CXCR7 soit associée à une accumulation intracellulaire des RCKs. Nos expériences de perméabilisation cellulaire ont permis de soulever deux faits marquants. Le premier fait état d'une prédominance cytosolique anormale de CXCR4 dans les trois sous-populations de LB de patients, situation qui contraste clairement avec la localisation majoritairement membranaire de CXCR4 dans les LB de témoins (6). Le second révèle une présence quasi exclusive de CXCR7 dans le compartiment intracellulaire des LB. Il est important de souligner que l'activité et la durée de la maladie ainsi que le type de traitement immunosuppresseur n'impactent pas l'expression des deux RCKs.

### **Profils migratoires défectueux des lymphocytes B en réponse à CXCL12**

Enfin, nous avons évalué dans quelle mesure l'anomalie de compartimentalisation de CXCR4 et de CXCR7, à savoir une diminution membranaire combinée à une accumulation intracellulaire, module la capacité des LB de patients à répondre à l'action chimiotactique de CXCL12. Nos tests de chimiotaxie réalisés en chambre de transwell indiquent une profonde altération de la migration des trois sous-populations de LB de patients en réponse à CXCL12. La migration résiduelle s'avère cependant sensible à l'AMD3100, un antagoniste sélectif de CXCR4, suggérant une contribution active de la forme membranaire de CXCR4 dans ce processus migratoire. Par conséquent, nos résultats soulignent qu'une altération de l'expression de CXCR4 et de CXCR7 chez les patients atteints de LED provoque une perte de réponse des LB à CXCL12.

### **Mécanismes de l'anomalie de CXCR4 dans le LED**

CXCR4, le premier RCK décrit de CXCL12, participe à l'homéostasie des LB à l'état basal mais aussi à la progression de désordres auto-immuns dépendants des LB tel que le LED. Nos travaux

révèlent une corrélation inverse entre le niveau d'expression membranaire de CXCR4 et le degré de différenciation des LB aussi bien chez les sujets sains que lupiques. Cependant, chez les patients, la fréquence de cellules CXCR4<sup>+</sup> et le nombre de sites CXCR4 par cellule sont significativement diminués dans les sous-populations de LB naïfs, mémoires et PC. Ceci suggère que la perte d'expression membranaire de CXCR4 résulte d'un défaut intrinsèque à CXCR4 plutôt que de l'expansion d'une nouvelle population de LB dépourvus de ce RCK à leur surface. La diminution de la proportion de LB CXCR4<sup>+</sup> circulants pourrait également s'expliquer par une migration incontrôlée de ces cellules vers des sites chroniquement enflammés et fort producteurs de CXCL12 tels que le rein et la peau, au sein desquels les LB s'accumuleraient anormalement. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le défaut d'expression de CXCR4 à la surface des LB restent à élucider, mais pourraient impliquer une anomalie de synthèse ou de routage intracellulaire de CXCR4. A cet égard, il est intéressant de noter que le LED est une maladie polygénique pour laquelle la prévalence et les signes cliniques diffèrent en fonction de l'origine ethnique des populations étudiées. Un polymorphisme du gène codant CXCL12 a d'ailleurs été identifié dans une cohorte de patients mexicains (7). Il reste à explorer si de tels polymorphismes du gène codant CXCR4 pourraient rendre compte de l'anomalie transcriptionnelle observée dans le LED. D'autres acteurs tels que les cytokines inflammatoires pourraient contribuer à la perte d'expression et de fonction de CXCR4. Par exemple, le TNF- $\alpha$  et l'Interféron de type I modulent négativement l'expression membranaire de CXCR4 et s'avèrent augmentés dans le sérum des patients lupiques. L'IL-17, qui est largement produite par les LT auxiliaires de type Th17 et dont les taux sériques corrélerent avec le LED, constitue un candidat à considérer (8). Récemment, une étude a rapporté dans un modèle murin auto-immun le rôle majeur de l'IL-17 dans la différenciation splénique des LB auto-réactifs (9). Son mode d'action serait de diminuer la réponse des LB à CXCL12, provoquant ainsi leur séquestration dans les centres germinatifs. Par conséquent, il semble intéressant d'évaluer si une exposition chronique à ces cytokines module l'expression de CXCR4 à la membrane des LB et affecte le

potentiel migratoire des LB auto-réactifs. Enfin, l'augmentation sérique de CXCL12 chez les patients pourrait être à l'origine d'une internalisation exacerbée de CXCR4. La détection d'une accumulation intracellulaire anormale de CXCL12 dans les LB permettrait de vérifier cette hypothèse.

### **Rôle biologique de CXCR7 dans les lymphocytes B**

L'expression de CXCR7 dans les leucocytes murins et humains est largement débattue dans la littérature. Néanmoins, nos données révèlent sans ambiguïté non seulement la présence de transcrits codant pour CXCR7 dans les leucocytes de témoins, mais également une diminution de leurs produits - aussi bien l'ARNm que les protéines - de CXCR7 dans les cellules de patients. Ceci suggère un défaut d'expression du gène codant pour CXCR7 dont le mécanisme de régulation reste à élucider. Fait intéressant, la compartimentalisation intracellulaire majoritaire de CXCR7 pourrait être intimement liée à ses activités biologiques dans les LB. En effet, son profil intracellulaire est compatible avec la notion d'un récepteur qui cycle rapidement entre la membrane plasmique et le cytosol, de façon spontanée ou en réponse à son ligand, et qui se comporte comme un récepteur «decoy» (10). De fait, il est tentant de spéculer que CXCR7 agit comme tel dans les LB humains, capable de capturer l'excès extracellulaire de CXCL12 et d'optimiser la réponse chimiotactique des LB à CXCL12 via CXCR4. En outre, la formation d'hétérodimères entre CXCR4 et CXCR7 constitue un autre moyen permettant de moduler la réponse à CXCL12, qui doit être envisagé dans le contexte du LED (11). Une augmentation de CXCL12 pourrait forcer les dimères CXCR4/CXCR7 à l'internalisation, ce qui se traduirait par la localisation intracellulaire anormale des deux RCKs dans les LB de patients. Ceci reste bien évidemment à investiguer notamment par l'utilisation d'antagonistes spécifiques.

### **CXCR4 et CXCR7 : bio-marqueurs dans le LED ?**

Les dernières avancées thérapeutiques indiquent que l'utilisation de l'Epratuzumab, un Ac humanisé dirigé contre l'antigène membranaire CD22, conduit à la déplétion préférentielle des LB naïfs, ce qui semble bénéfique aux patients lupiques. De manière

intéressante, une étude récente indique que l'Epratuzumab impacte *in vitro* sur l'expression de certaines molécules d'adhésion (ex : CD62L) tout en augmentant la migration des LB de patients en réponse à CXCL12 (12). Cela suggère que l'Ac altère le trafic des LB entre le sang, les organes lymphoïdes et les principaux sites inflammatoires. Il reste à déterminer si l'effet bénéfique de l'Epratuzumab repose sur un gain d'expression de CXCR4 et/ou de CXCR7 dans les LB de patients. En conclusion, nos résultats dévoilent pour la première fois une diminution de CXCR4 et de CXCR7 à la surface des LB circulants de patients lupiques. Cette anomalie est associée à une compartimentalisation intracellulaire anormale des deux RCKs, ce qui engendre une perte de réponse à CXCL12. Par conséquent, la diminution de l'expression de CXCR4 et de CXCR7 pourrait constituer de nouveaux biomarqueurs du LED.

#### REFERENCES

1. Rahman A et al 2008. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 358:929-939.
2. Mitchison N et al 2000. B cells in autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8750-8751.
3. Chong B et al 2009. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin. Ther. Targets* 10:1147-1153.
4. Balabanian K et al 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280:35760-35766
5. Pisetsky D et al 2011. Are autoantibodies the targets of B-cell-directed therapy? *Nat Rev Rheumatol* 9:551-6
6. Palmesino E et al 2006. Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells. *Immunobiology* 211:377-89
7. Lima G et al 2007. MCP-1, RANTES, and SDF-1 polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 68:980-985
8. Doreau A et al 2009. Interleukin-17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 10:778-785.
9. Hsu H. et al 2008. Interleukin-17-producing T helper cells and interleukin-17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 9:166-175.
10. Naumann U et al 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 5:e9175.
11. Levoye A et al 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signalling. *Blood* 113: 6085-6093.
12. Daridon C et al 2010. Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 12:R204.

