HAL
open science

Interleukine-24 : rôle immunologique et mécanismes d'induction de mort cellulaire dans les lymphocytes B

Nader Hadife

To cite this version:

Nader Hadife. Interleukine-24 : rôle immunologique et mécanismes d'induction de mort cellulaire dans les lymphocytes B. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0018 . tel-01749415

HAL Id: tel-01749415

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749415v1

Submitted on 29 Mar 2018

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 DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Nader HADIFE

Interleukine-24 : Rôle immunologique et mécanismes d'induction de mort cellulaire dans les lymphocytes B

Soutenue publiquement le 25 Avril 2013

MEMBRES du jury :

Rapporteurs :	**Mme. le docteur Véronique MACHELON**	**Université Paris-Sud, Clamart**
	M. le professeur Jean-Claude LECRON	**Université de Poitiers, Poitiers**
Examinateurs :	**M. le professeur Bernard FOLIGUET**	**Université de Lorraine (Président du Jury)**
	M. le professeur Ali DALLOUL	**Université de Lorraine (Directeur de thèse)**

Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine,
EA 4369 RHEM, 54505 Vandoeuvre Lès Nancy cedex-FRANCE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Nader HADIFE

Interleukine-24 : Rôle immunologique et mécanismes d'induction de mort cellulaire dans les lymphocytes B

Soutenue publiquement le 25 Avril 2013

MEMBRES du jury :

Rapporteurs :	**Mme. le docteur Véronique MACHELON**	**Université Paris-Sud, Clamart**
	M. le professeur Jean-Claude LECRON	**Université de Poitiers, Poitiers**
Examinateurs :	**M. le professeur Bernard FOLIGUET**	**Université de Lorraine (Président du Jury)**
	M. le professeur Ali DALLOUL	**Université de Lorraine (Directeur de thèse)**

Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine,
EA 4369 RHEM, 54505 Vandoeuvre Lès Nancy cedex-FRANCE

A ma mère et mon frère

A l'âme de mon père et ma soeur

A mes amis et amies

Remerciements

Je remercie la Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) ainsi que la Société Française d'Hématologie (SFH) pour leur support financière. Je suis conscient que c'est une chance sans laquelle je n'aurais sans doute pas réalisé ce rêve. Je Salue également l'Université Henri Poincaré, l'UFR Sciences et Techniques et l'école doctorale BioSE.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me font le Professeur Jean-Claude LECRON et le docteur Véronique MACHELON en acceptant d'être rapporteurs et de juger ce travail. Je les remercie pour toutes leurs critiques enrichissantes.

Je remercie également le Professeur Bernard FOLIGUET d'avoir accepté d'être président du jury. Je le remercie également pour la vacation qu'il m'avait donnée à la maternité régionale de Nancy pendant un an et demi.

La réalisation de cette thèse n'aurait jamais été possible sans l'aide de nombreuses personnes envers lesquelles je suis infiniment redevable. Aussi, je tiens tout particulièrement à les remercier.

Merci aux Professeurs Gilbert FAURE et Marie-Christine BENE de m'avoir accueilli dans leur équipe d'accueil (EA4369).

Je remercie infiniment le Professeur Ali DALLOUL qui a été le directeur de thèse pendant ces quatre années. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son équipe. Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Ses enseignements ont toujours été d'une grande qualité, m'ont énormément apporté et resteront un exemple pour moi.

Enfin, je remercie tous qui font ou qui ont fait partie de l'EA4369.

Merci à Christophe NEMOS pour m'avoir apporté son aide technique en Bio puces à ADN.

Je tiens à remercier également toute l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Nancy et plus particulièrement mon ami Fred pour m'avoir apporté son aide technique en cytométrie de flux.

Je remercie le Professeur Jean-pol FRIPPIAT, le chef du JE 2537, pour m'avoir donné l'occasion de faire les manips de biologie moléculaire au sein de son laboratoire.

Je remercie également toute l'équipe du JE 2537, et plus particulièrement, Mathieu, Nathan, Véronique, Fanny, Guillaume, Oussama, et Nassima pour leur amitié et leur sympathie. Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on avait passés ensemble.

Je voudrais enfin rendre hommage à mes proches

Merci à ma mère, mon frère, mon oncle Gassan qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les moments difficiles.

Je suis infiniment redevable à mon unique et exceptionnel frère, Fadi, d'avoir suivi et réglé ma situation professionnelle au Liban pendant toutes mes années d'études en France. Je sais que ce n'était pas assez facile pour lui. Je le remercie également d'avoir rempli ma place envers ma mère pendant que je n'étais pas à côté d'elle. Je le remercie de fond du mon cœur.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ad.Mda-7: Recombinant adenovirus vector encoding for human Mda-7
ADN: Acide désoxyribonucléique
AIF: Apoptosis inducing factor
AP: Apyrimidinic endonuclease
Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1
ARNm: Acide ribonucléique messager
ATP: Adénosine triphosphate
Bad: Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter
BAFF: B-cell-activating factor belonging to the TNF family
Bag1: Bcl2-associated athanogene 1
Bak: Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax: Bcl-2 associated x protein
BCL: B cell lymphomas
BCMA: B cell maturation antigen
BET: Bromure d'éthidium
Bid: BH3 interacting domain death agonist
Bim: Bcl-2 interacting mediator of cell death
BM: Bone marrow
BP: Binding protein
BSA: Bovin serum albumin
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein
Caspase: Cystein aspartate proteases
CG: Centre germinatif
CLL: Chronic lymphocytic leukemia
CLP: Common lymphoid progenitor
CMP: Common myeloid progenitor
Cre : Cyclic AMP response element
CSR: Class Switch Recombination
DC : Dendritic cell
DEPC : Diéthyl pyrocarbonate
DIABLO: Direct IAP binding with low pI
DMSO: Diméthyl sulfoxyde
dNTP: Désoxyribonucléosides triphosphate
DTT: Dithiotréitol
ELP: Early lymphoid progenitor
Endo G: Endonuclease G
Erk: Extracellular signal-regulated kinases
ETP: Early thymocyte progenitor
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FADD: Fas-associated death domain
Fc: Fragment cristallisable
FcγR: Fc-gamma receptor
FITC: Fluorescéine isothiocyanate
FLIP: FADD-like ICE inhibitory proteins
GADD: Growth arrest and DNA damage
GM-CSF: Granulocyte Maacrophage Colony –Stimulating Factor
HtrA2: High temperature requirement protein A2
IAP: Inhibitors apoptosis proteins

ICE: Interleukin -1β converting enzyme
IGF1-R: Insulin groth factor1 receptor
IL-R: Interleukin receptor
INF: Interferon
IRF4: Interferon regulatory factor 4
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK: Janus Kinase
KDa: Kilodalton
KID2DL: Killer-cell immunoglobulin-like receptors 2 DL
KO: knock-out
LMPP: Lymphoide multipotent progenitor
MAPK: Mitogen Acrivated Protein Kinase
MCL-1: Myeloid leukemia cell differentiation protein 1
MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1
MIP1: Macrophage inflammatory protein 1
MPP: Multipotent progenitor
NCR1: Natural cytotoxicity triggering receptor 1
NF-kB: Nuclear factor-kB
NK: Natural killer
PALS: Periarteriolar lymphoid sheath
P**AX5**: Paired Box Protein 5
PBMC: *P*eripheral blood mononuclear cells
PBS: Phosphate buffer saline
PCR: Polymerase chain reaction
PD1: Protein disulfures isomerase
PI3K: Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RANTES: Regulated and normal T cell expressed and secreted
SDF-1: *S*tromal cell-derived factor 1
SDS: Sodium dodécysulfate
Si-RNA: Small interfering RNA
SMAC: Second mitochondria derived activator of caspases
SOCS: Suppressor of cytokine signaling
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
S**VF**: *S*erum Veau Foetal
TAE: Tris acétate EDTA
TBS: Tris base SDS
TD: Thymo-Dependent
T_{FH}: Follicular B helper T cell
TI: Thymo-Independent
TNF: Tumor necrosis factor
TRAIL: TNF related apoptosis inducing ligand
Tregs : lymphocytes T régulateurs
Tris: Tri-(hydroxyméthyl) amino méthane
V_H: Région variable de la chaîne lourde des Ig
XBP1: X-box binding protein 1
β-ME: β-mercapto ethanol

RESUME

Notre équipe a précédemment démontré que l'Interleukine (IL)-24, une cytokine de la famille de l'IL-10, a un effet cytostatique voire cytotoxique sur des cellules B normales ou leucémiques mises préalablement en cycle, mais non sur des cellules quiescentes. L'IL-24 inhibe également la différenciation plasmocytaire des cellules B humaines du centre germinatif dans un modèle de différentiation *in vitro*. Nous avons utilisé ce modèle pour analyser pour la première fois le transcriptome de cellules B stimulées ou non par IL-24 au bout de 6 et 36 h. Plusieurs transcrits impliqués dans le métabolisme et la réplication de l'ADN sont inhibés précocement à l'exception d'IGF-1 qui est stimulé. L'IGF1 ayant été décrit comme une molécule de survie des cellules B ou pré-B, nous avons analysé son effet biologique et démontré qu'il a au contraire un rôle proapoptotique à doses physiologiques. En revanche, l'IL-24 induit l'expression plus tardive des gènes de la voie mitochondriale de la mort cellulaire programmée (MCP). Cet effet est également retrouvé dans des LLC « IgVH mutées » ou non mais avec une cinétique distincte des cellules B normales. Au total, dans des cellules activées au préalable, l'IL-24 induit séquentiellement un blocage précoce du cycle cellulaire suivi d'une apoptose. D'autres gènes potentiellement importants dans la synapse immune ainsi que dans la régulation de l'immunité innée sont décrits et suggèrent que l'IL-24 a un rôle immunologique particulier au-delà de son effet cytostatique et potentiellement anti-tumoral.

MOTS-CLES : Cytokines de classe II, IL-24, Lymphocytes B, Centre Germinatif, LLC, Apoptose.

ABSTRACT

We have previously shown that Interleukin(IL)-24, a class-II cytokine of the IL-10 family, has cytostatic and cytotoxic properties on normal and malignant human B-cells previously engaged into the cell cycle, but not on quiescent B-cells. IL-24 also inhibits the differentiation of germinal center B-cells in plasma cells in an *in vitro* model; the later was used to compare for the first time the transcriptome of B-cells cultured or not with IL-24 for 6 and 36h. Several "early" transcripts involved in DNA metabolism and replication were inhibited whereas that of *Igf1* a molecule described as a B-cell growth factor was induced. We show herein that IgF1 has instead a proapoptotic role on B-cells at physiological concentrations. In contrast, several genes of the intrinsic apoptotic pathway were stimulated after 36h. This expression pattern was also found in CLL cells whether they were "IgVH mutated" or "unmutated", albeit with distinct kinetics from normal B-cells. In addition several genes belonging to the immune synapse and innate immunity were regulated by IL-24. These results disclose additional, possibly immunoregulatory properties, for IL-24 than its already described cytostatic and potentially anti-tumoral effects.

KEYWORDS: Class II Cytokines, IL-24, B-lymphocytes, Germinal Center, CLL, Apoptosis.

AVANT PROPOS **1**
INTRODUCTION **3**
LES LYMPHOCYTES B **3**
1 Retour historique : la découverte des anticorps et des lymphocytes B **3**
2 La contribution des lymphocytes B à la réponse immunitaire **3**
3 Ontogénie des lymphocytes B **6**
3.1. Différents stades de différentiation des lymphocytes B 6
3.2. La diversité du répertoire d'anticorps et la théorie de sélection clonale 9
3.3. Le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse : les réarrangements génétiques et la tolérance au soi 10
3.4. Les lymphocytes B transitionnels et leur maturation au niveau de la rate 12
4 La réponse des lymphocytes B matures aux différents types d'Ag **13**
4.1. La réponse des lymphocytes B aux Ag T-indépendants de type I 13
4.2. La réponse des lymphocytes B aux Ag T-indépendants de type II 14
4.3. La réponse des lymphocytes B aux antigènes T-dépendants 14
4.3.a. L'initiation de la réponse des lymphocytes B naïfs 16
4.3.a.i. Le recrutement des Ag et des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires 16
4.3.a.ii. La première interaction spécifique lymphocytes B naïfs – lymphocytes T 18
4.3.b. Les CG et leur fonction 20
4.3.b.i. L'expansion et la sélection des lymphocytes B 20
4.3.b.ii. Les changements moléculaires se déroulant dans les CG 24
4.3.b.iii. La mémoire immunologique en réponse aux Ag T-dépendants 26
4.3.c. La réponse extrafolliculaire des lymphocytes B naïfs 34
LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC)- B **35**
1 Définition et historique **35**
2 Etiologie et Pathogénèse **36**
2.1. Facteurs environnementaux et héréditaires 36
2.2. Cytogenèse 36
2.3. Anomalies cytogénétiques 37
2.4. Modèle animal pour la LLC 38
2.5. Accumulation de cellules leucémiques 39
3 Rôle de Mda-7/IL-24 dans la leucémie lymphoïde chronique **41**
LES CYTOKINES DE CLASSE II **43**
1 Généralités **43**
2 Fonctions biologiques des cytokines de classe II **46**
2.1. IL-10 47
2.2. Mda-7/IL-24 49
2.2.a. Structure du gène Mda-7/IL-24 49
2.2.b. Expression de Mda-7/IL-24 50
2.2.c. Orthologues de Mda-7/IL-24 51
2.2.d. Récepteurs de Mda-7/IL-24 51
2.2.e. Rôle de Mda-7/IL-24 dans le système immunitaire 52
2.2.f. Rôle de Mda-7/IL-24 dans le cancer 53
APOPTOSE **55**
1 Généralités sur le processus d'apoptose **55**
1.1. Définition 55
1.2. Rôles physiologiques de l'apoptose 56
1.3. Les différentes voies de l'apoptose 56
OBJECTIFS **60**
MATERIEL ET METHODES **62**
1 Première partie : les modèles d'étude **62**
1.1. Les cellules B d'amygdales 62
1.1.a. Préparation des suspensions amygdaliennes 62
1.1.b. Isolement des lymphocytes totaux 63
1.1.c. Comptage et étude de la viabilité cellulaire 63
1.1.d. Isolement des lymphocytes B 64

1.1.e. Traitement et culture des lymphocytes B 65
1.2. Les cellules B de LLC 66
1.2.a. Patients et prélèvements 66
1.2.b. Isolement des lymphocytes B de LLC 67
1.2.c. Traitement et culture des lymphocytes B de LLC 67
2 Deuxième partie : Exploration phénotypique et fonctionnelle par cytométrie en flux 67
2.1. Cytométrie en flux 67
2.2. Etude immunophénotypique des lymphocytes B normaux et ceux de LLC 70
2.3. Etude de l'expression d'IGF1-R 70
2.4. Etude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire 70
2.5. Etude des caractéristiques de l'apoptose 71
2.5.a. Détection des Phosphatidyl Sérines par l'Annexine V 71
2.5.b. La dépolarisation des membranes mitochondriales 72
2.5.c. La diminution de nombre de mitochondries dans les cellules apoptotiques. 72
3 Troisième partie : Etude de l'expression des ARN messagers 73
3.1. Extraction des ARN totaux 73
3.1.a. Extraction au Trizol 73
3.1.b. Extraction sur colonne (RNeasy Mini Kit – Qiagen) 73
3.2. Préparation des échantillons 74
3.3. Etude de l'expression des ARN messagers par la technique des Biopuces 74
3.4. RT-PCR semi quantitative et PCR en temps réel (qPCR) 75
3.4.a. Transcription inverse (RT) 75
3.4.b. PCR semi quantitative 75
3.4.c. PCR quantitative ou en temps réel 77
4 Quatrième partie : Etude de l'expression des protéines (Western Blot) 82
4.1. Préparation des échantillons 82
4.1.a. Extraction des protéines 82
4.1.b. Dosage des protéines (Méthode de Bradford ou Bleu de Coomassie) 82
4.1.c. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 83
4.1.d. Transfert des protéines sur membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride) ou Dot Boltting 83
4.1.e. Blocage de la membrane 84
4.1.f. Incubation avec des anticorps monoclonaux primaires 84
4.1.g. Incubation avec des anticorps polyclonaux secondaires 84
4.1.h. Détection par chimiluminescence (ECL) 85
RESULTATS 87
1 Effets transcriptomiques de l'IL-24 sur les lymphocytes B 87
2 Régulation de l'expression de l'IL-24 dans les lymphocytes B normaux. 91
3 Expression du récepteur de l'IL-24 dans les lymphocytes B 92
4 Expression du récepteur de l'IGF1 par les lymphocytes B d'amygdales ainsi que ceux de la LLC 96
5 L'inhibition de la voie de signalisation de l'IGF1 reverse les effets biologiques de l'IL-24 98
6 IL-24 induit la voie d'apoptose mitochondriale dans les lymphocytes B activés 99
7 L'apoptose des lymphocytes B activés induite par l'IL'24 est p53 dépendante 101
DISCUSSION 105
1 IL24 et Apoptose 105
2 Expression et induction de Mda-7/IL-24 dans les cellules immunitaires 108
3 Effet de l'IL-24 sur les cellules immunitaires 110
4 IL24 et lymphocytes B 111
5 IL24 et plasmocytes à vie courte 112
6 IL24 et lymphocytes B mémoires 113
7 Aspect controversé de l'expression de l'IL-24R dans les LB 114
8 Rôle de l'IL-24 dans le système immunitaire 114
9 Effet antiviral potentiel de l'IL-24 115
10 IL-24 et autres cytokines de la famille de l'IL-10 116
PERSPECTIVES 119
1 Mécanisme d'action de l'IL-24 119
2 IL-24 et immunité 119

2.1. IL-24 et la réponse B T-dépendante 119
2.2. IL-24 et la réponse B T-indépendante 120
2.3. IL-24 et la fonction des cellules présentatrices de l'antigène (APC) 120
3 IL-24 et Tumeurs 122
3.1. LLC 122
3.2. Autres cancers 122
4 L'IL-24 et les cellules endothéliales 122
5 L'IL-24 et vaccinations 123
TRAVAIL ANNEXE 125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 128

AVANT PROPOS

Le gène Mda-7 (Melanoma Differentiation Associated gene 7) a été cloné en 1995 par hybridation soustractive à partir de mélanocytes normaux différenciés *in vitro* en présence d'IFN-β et Mezeréine (Jiang et al., 1995). L'expression de ce gène est inhibée en cas de différentiation cellulaire, en particulier dans les mélanomes malins. Il a donc été conclu que le produit du gène Mda-7 pouvait bloquer la prolifération tumorale. En effet, l'introduction du cDNA de Mda-7 dans des lignées de cancer du sein, ovaire, bronches ou mélanome provoque l'apoptose. Plus tard, il a été montré que Mda-7 code pour une protéine sécrétée, nommée interleukine 24 (IL-24) et dont la structure et les récepteurs l'apparentent aux cytokines de type II de la famille de l'IL-10. Bien que le Mda7 soit cytostatique, aucune maladie n'a encore été découverte avec un déficit (quantitatif ou fonctionnel) de Mda-7, associé par exemple à un cancer donné. Par conséquent, il n'existe aucune preuve directe que ce gène soit un suppresseur de tumeur comme évoqué par l'équipe de P.B Fisher. De plus, nous n'avons pas eu connaissance de résultats publiés sur le « KO » du gène Mda-7 (est-il létal ? ou bien silencieux ?).

Nos travaux ont porté sur la lignée lymphocytaire « DAUDI », dans laquelle l'introduction du gène CD5 induit l'expression de plusieurs gènes de la famille de l'IL-10 et de leurs récepteurs y compris le gène Mda-7/IL-24. Nous avons observé que les cellules B $CD5^+$ de la leucémie lymphoïde chronique sont fortement $IL\text{-}24^+$ par rapport aux cellules B normales (Sainz-Perez et al., 2006). En revanche, l'IL-24 recombinante, provoque l'apoptose de cellules leucémiques en culture après stimulation par l'IL-2 (Sainz-Perez et al., 2008). Il est à signaler que la leucémie lymphoïde chronique est due à l'amplification d'un clone malin de cellules B de type mémoire et que dans cette maladie les lymphocytes B ne se différencient pas en plasmocytes *in vivo*, d'où une hypo-gammaglobulinémie. En accord avec cette observation, notre équipe a montré que l'IL-24 inhibe la différentiation plasmocytaire des cellules B normales du centre germinatif (Maarof et al., 2010). Dans le prolongement de ces travaux, l'objectif de ma thèse a donc été : 1) d'analyser les mécanismes moléculaires de l'action de cette cytokine sur les cellules B normales et de la leucémie lymphoïde chronique 2) de mettre en évidence les mécanismes physiologiques de production de l'IL-24 dans les lymphocytes 3) d'explorer les effets immunologiques de cette cytokine en dehors de l'effet cytostatique et cytotoxique.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

LES LYMPHOCYTES B

1 Retour historique : la découverte des anticorps et des lymphocytes B

C'est à la fin du XIXe siècle, à la suite des travaux séquentiels de Emil Von Behring et de Paul Ehrlich, que l'existence de molécules solubles spécifiques, connues d'abord sous le nom d'antitoxine puis sous le nom d'anticorps (Ac) ou immunoglobuline (Ig), ont été mises en évidence dans le sang (Ehrlich, 1899). À cette époque, des essais étaient déjà mis en place afin d'exploiter les propriétés protectrices de ces molécules, aussi bien à titre de traitement que d'immunisation passive contre diverses maladies, dont la diphtérie. Il fallut cependant près de 70 ans de plus pour découvrir, par les travaux de Mitchell et Miller (Miller and Mitchell, 1968; Miller, 1999; Mitchell and Miller, 1968), que la production de ces Ac était spécifiquement l'apanage des lymphocytes B, ou cellules B, qui ont été nommés ainsi par Roitt et collaborateurs (Roitt et al., 1969) à cause de leur dérivation de la bourse de Fabricius chez les oiseaux (B pour ***Bursa***), par opposition aux lymphocytes T dérivant du thymus. En plus de séparer pour la première fois la population de lymphocytes en deux sous-populations distinctes, leurs travaux ont également suggéré un rôle auxiliaire d'importance aux lymphocytes T en regard à la production d'Ac. Bien que ces découvertes ont été accueillies avec critique et perçues par certains comme « compliquant les choses » (Miller, 1999), plusieurs avancées dans le domaine de l'immunologie ont suivi, validant le phénomène de la collaboration lymphocytes T-B, éclaircissant les étapes de la maturation et de la réponse des lymphocytes B, autant au niveau cellulaire que moléculaire.

2 La contribution des lymphocytes B à la réponse immunitaire

Lorsque l'intégrité d'un organisme est menacée par l'entrée d'un pathogène, une réponse immunitaire se met en jeu afin de contrôler l'infection en cours. Dans un premier temps, les mécanismes de défense de l'immunité innée ou naturelle entrent en jeu. Ces mécanismes sont normalement codés dans la version germinale des gènes de l'hôte, n'étant pas spécifiques à l'antigène (Ag) envahissant (Chaplin, 2006). Parmi les principaux acteurs de cette réponse, on retrouve les macrophages, les neutrophiles et les monocytes, dont la responsabilité repose sur la phagocytose du pathogène. Un rôle est également attribué aux lymphocytes B, résidant

dans le maintien des Ac en circulation dans l'organisme (Manz et al., 2005). Étant principalement de type IgM, mais pouvant aussi être de type IgA et IgG (Manz et al., 2005), les Ac dont il est question sont de faible affinité et polyréactifs, pouvant reconnaître plus d'un Ag (Baumgarth et al., 2005; Manson et al., 2005). Ils sont couramment qualifiés d'Ac « naturels » parce qu'ils sont générés par une sous-population particulière de lymphocytes B, dits B1, soit selon certains en absence de stimulation antigénique (Baumgarth et al., 2005 ; Manson et al., 2005) ou soit selon d'autres à la suite d'une activation constante par des bactéries, des mitogènes ou des auto-antigènes (Manz et al., 2005). Ils contribuent clairement à la première ligne de défense de l'organisme en remplissant des fonctions comparables aux Ac dits « immuns », dont la neutralisation des particules antigéniques, leur opsonisation et l'activation du complément en vue de les détruire (Baumgarth et al., 2005 ; Manson et al., 2005). Une représentation de ces fonctions lors d'une infection virale est présentée en figure 1 (Hangartner et al., 2006).

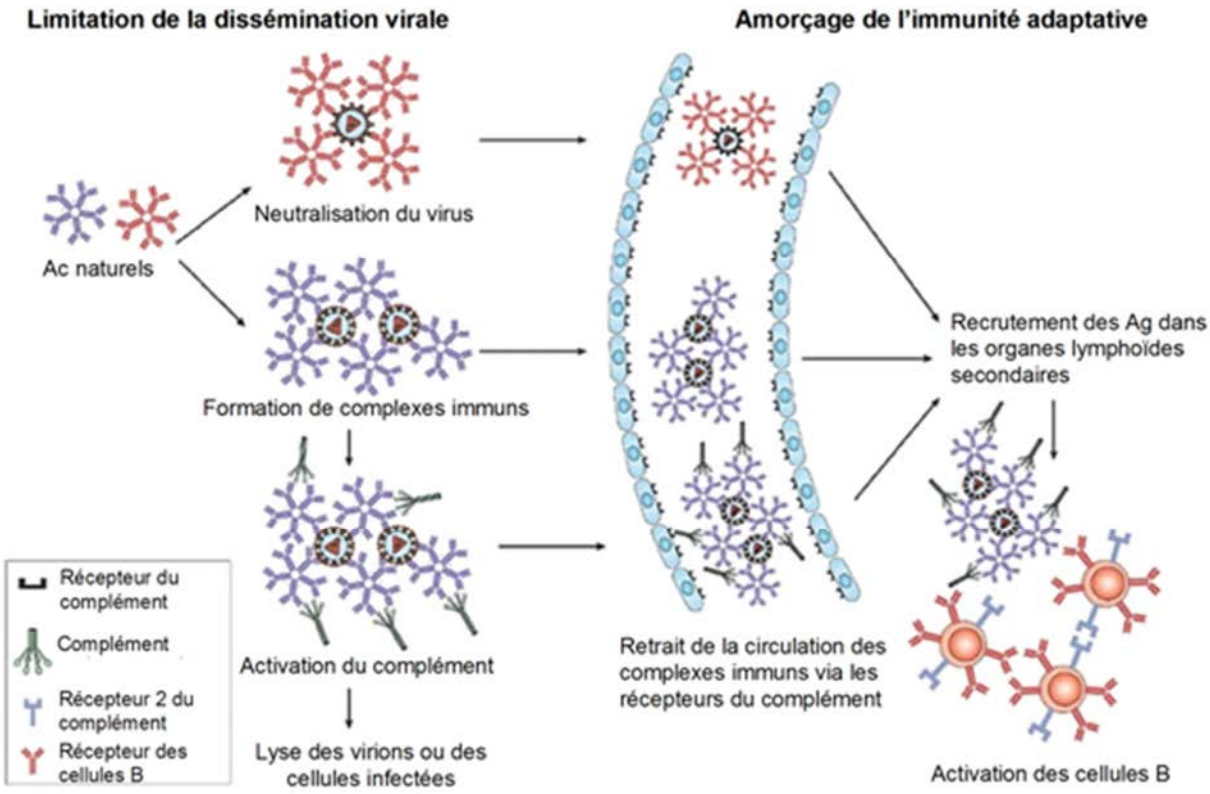


***Figure 1* : les Ac naturels représentent un lien important entre l'immunité innée et adaptative. Ils permettent de prendre en charge l'infection temporairement, le temps qu'une réponse spécifique se mette en place. Les principales fonctions des Ac naturels ainsi que l'amorçage de l'immunité adaptative sont démontrées ici (D'après Hangartner et al ., 2005).**

Une fois l'infection prise en charge temporairement par les mécanismes de l'immunité innée, les lymphocytes B s'apprêtent à remplir leur rôle primordial s'insérant dans l'immunité adaptative : engendrer une réponse spécifique au pathogène envahissant, par la production massive d'Ac spécifiques de haute affinité. Cette réponse immunitaire, aussi dite acquise, implique également les lymphocytes T, dont l'étroite collaboration avec les cellules B est nécessaire afin de générer les cellules spécialisées dans la sécrétion d'Ac nommées plasmocytes. Contrairement à l'immunité innée, l'élaboration de cette réponse repose sur la modification de certains gènes de l'hôte, particulièrement ceux codant pour les récepteurs des cellules T (TCR pour *T cell receptor*) et celui des cellules B (BCR pour *B cell receptor*), conférant à ces cellules la capacité de reconnaître et de répondre spécifiquement à l'Ag (Chaplin, 2006). Chez les lymphocytes B, cette reconnaissance est médiée par une forme membranaire de l'Ac qui sera éventuellement sécrété par la cellule, à titre de molécule effectrice visant la neutralisation de l'Ag. La seconde particularité de la réponse adaptative est de générer une mémoire immunologique permettant une réponse rapide de l'organisme si l'infection survient de nouveau (Gourley et al., 2004). Cette fonction mémoire se traduit chez les lymphocytes B d'une part par la génération d'une sous-population persistante de cellules spécifiques à l'Ag en constante recirculation, que l'on nomme lymphocytes B mémoires (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a). Ces cellules à longue vie seront sollicitées lors de la réapparition de l'Ag et seront à la base de la réponse secondaire de défense. D'autre part, les lymphocytes B contribuent à la mémoire immunologique *via* la sécrétion soutenue d'Ac spécifiques par les plasmocytes dits à longue vie générés lors de la réponse primaire à l'Ag. Le maintien de ces cellules effectrices au niveau de la moelle osseuse assure à long terme un moyen de neutraliser ou d'éliminer les pathogènes et leurs toxines de l'organisme (Manz et al., 2005).

Par la production d'Ac, les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, qui se définit comme une protection que l'on peut transférer à une autre personne par le sérum contenant des Ac. Le pendant de l'immunité humorale est l'immunité dite cellulaire, qui englobe toutes les réponses adaptatives dans lesquelles les lymphocytes T spécifiques sont impliqués. Elle est par définition l'immunité qui ne peut pas être transférée par les Ac du sérum (D'après Chatenoud et Bach, l'immunologie de la biologie à la clinique 2008).

3 Ontogénie des lymphocytes B

3.1. Différents stades de différentiation des lymphocytes B

La différentiation des cellules B, à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH), se déroule dans la moelle osseuse. Les LB obtenus sont alors des cellules dites « immatures naïves ». Ils subissent plusieurs étapes de sélection positive et négative avant d'aboutir à un lymphocyte naïf. Les cellules B qui présentent des récepteurs (preBCR ou BCR) autoréactifs sont éliminées par délétion clonale. Ce processus est appelé Tolérance centrale. Plusieurs « checkpoints » de ce type existent et leur déficience peut aboutir à des maladies auto-immunes (Meffre and Wardemann, 2008; Tsuiji et al., 2006; Vinuesa et al., 2010) et à des pathologies lymphoïdes notamment la LLC. Dans les organes lymphoïdes secondaires a lieu la maturation de ces LB en cellules mémoires/effectrices et en plasmocytes à partir des cellules B folliculaires mais aussi extrafolliculaires. Les cellules B subissent également des processus de sélection positive et de délétion clonale dans le centre germinatif.

De nombreux facteurs de transcription interviennent au cours du développement des LB (Ramírez et al., 2010). Comme présenté dans la figure 2, le facteur IKaros, indispensable à la différenciation précoce de la CSH vers la voie lymphoïde (Yoshida et al., 2006), intervient très tôt dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques de la lignée B (Tonnelle et al., 2009). PU.1, un autre facteur interviendrait plutôt dans la bifurcation entre développement myéloïde et lymphoïde B. Le facteur E2A n'est pas nécessaire à l'expression d'IKaros, PU.1 et Gfil mais est requis pour l'expression d'EBF, Pax5 et pour le « programme » spécifique des LB. Il interviendrait aussi bien précocement dans la lymphogenèse B qu'au niveau de la maturation des LB au niveau des centres germinatifs (Kwon et al., 2008). Pax5, est quand à lui, un facteur majeur d'engagement et de maintien de la lignée B (Medvedovic et al., 2011) et des régulations épigénétiques du gène de Pax5 sont à l'origine de ces effets (Linderson et al., 2004). Enfin, EBF régule de nombreux gènes de la lignée B, et comme Pax5, est exprimé plus tardivement que les autres facteurs de transcription (Vilagos et al., 2012).

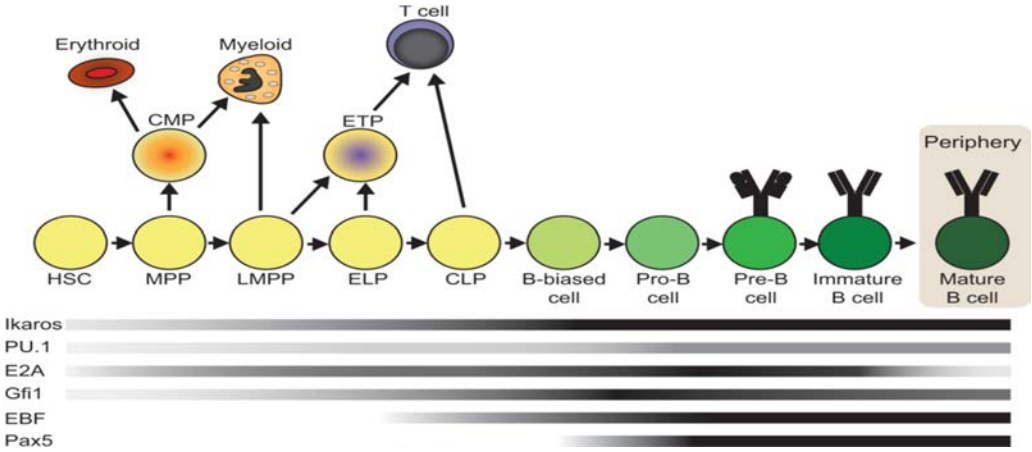


Figure 2 : Facteurs de transcription impliqués dans la lymphogenèse B (Ramirez et al., 2010).

Les différents stades de différentiation des LB sont bien caractérisés chez la souris et sont décrits précisément dans la figure 3. Ils sont déclinés en stade pro/pré BI, en stade pré-BII qui peut se subdiviser lui-même en deux, en stade B immature, en stade B transitionnel et enfin en stade B mature comprenant plusieurs types de LB (Tussiwand et al., 2009).

Le stade pro/pré BI : la cellule B, à ce stade, possède encore le marqueur de CSH qui est le CD34 et déjà des marqueurs plus spécifiques de la lignée B comme CD19 (qui persistera jusqu'au stade de différentiation plasmocytaire) et le marqueur CD117 (c-kit). Ces cellules n'expriment pas CD20 et ne possèdent qu'un « pro-récepteur » à l'antigène. Leur engagement dans la lignée B est à ce stade réversible (Medvedovic J et al., 2011) et peut être annulé par l'ablation du gène Pax5.

Le stade pré-BII : la progression vers le stade pré-B se caractérise par la disparition du CD34 et du CD117 et la présence de la plupart des marqueurs caractérisant les LB (dont le CD20). Ce stade est également associé à l'activation des systèmes enzymatiques responsables des réarrangements des gènes des Ig [enzymes RAG (Recombination Activating Gene) 1 et 2] à l'origine de la synthèse d'une chaîne lourde et la cellule B possède alors un pré-BCR. Seules les cellules qui possèdent ce pré-récepteur vont proliférer et on parle alors de pré-BCR « checkpoint » (Tussiwand et al., 2009).

Stade B immature : les cellules, après une phase d'expansion, deviennent plus petites et sont capables de synthétiser les chaînes légères des Ig et celles-ci s'associent aux chaînes lourdes pour former les Ig de classe IgM qui constituent le BCR exprimé à la surface des cellules B. Seuls les LB ayant un BCR fonctionnel reçoivent des signaux de survie (sélection positive) et vont proliférer. Les cellules sélectionnées positivement vont alors migrer de la moelle osseuse

vers la rate chez la souris pour compléter leur maturation (Sims et al., 2005). A ce stade, avant le départ de la moelle osseuse, il existe une sélection contre l'auto-réactivité, appelée « sélection négative », visant à détruire, par apoptose, les LB reconnaissant des antigènes du soi, c'est la tolérance « centrale ». De plus, lorsque les LB quittent la moelle osseuse, ils deviennent « sensibles » aux signaux de survie induit par BAFF (pour B-cell Activating Factor). Cette molécule de la famille du TNF, encore appelée BLyS, interagit avec son récepteur, BAFF-R présent à la surface des LB (Schneider, 2005). Ce facteur joue un rôle primordial dans la survie et la maturation des LB murins.

LB transitionnels : à ce stade, ces cellules expriment le CD93 alors que les LB matures ne l'expriment plus et présentent des IgM mais également des IgD (Tussiwand et al., 2009). Ces LB vont pouvoir se différentier en LB matures naïfs de trois types : LB de la zone marginale (BMZ), LB B1 et LB B2 ou folliculaires.

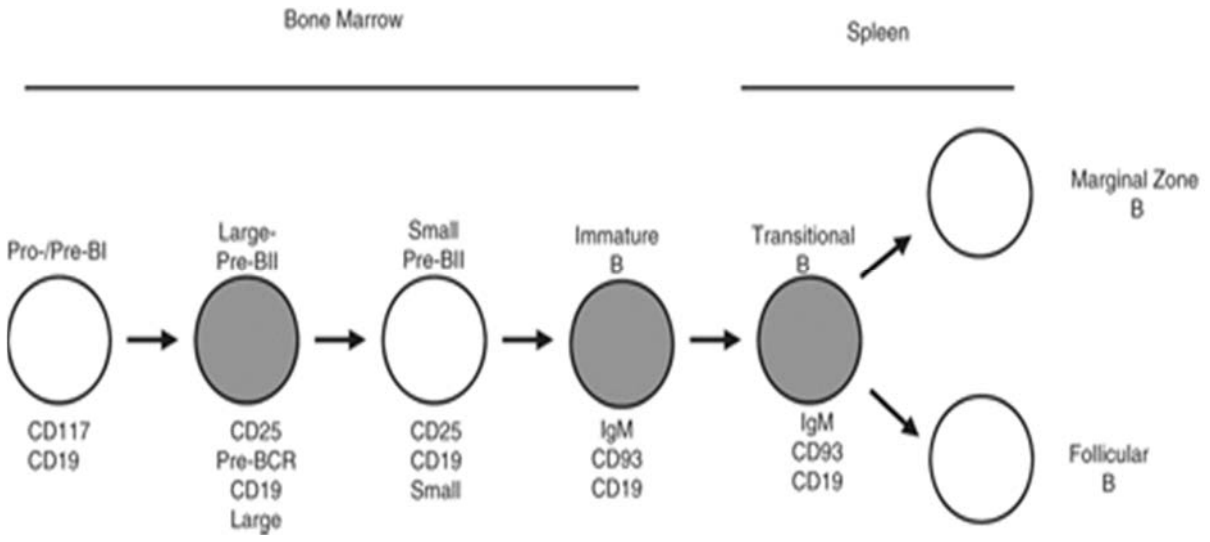


Figure 3 : Différents stades de développement des lymphocytes B chez la souris (Tussiwand et al., 2009).

Ces connaissances, obtenues chez la souris, ont permis d'étudier le développement des LB chez l'homme. La différentiation des LB dans la moelle osseuse chez l'homme est très proche de celle décrite ci-dessus chez la souris. Par contre, au niveau périphérique, des différences sont observées entre les deux espèces et les connaissances sont plus limitées chez l'homme.

Chez l'homme, les différents stades pro-B, pré-BI, pré-BII et LB immatures sont en effet retrouvés. Les différents marqueurs de ces sous-populations sont détaillés dans la figure 4 (page suivante) (Perez-Andres et al., 2010).

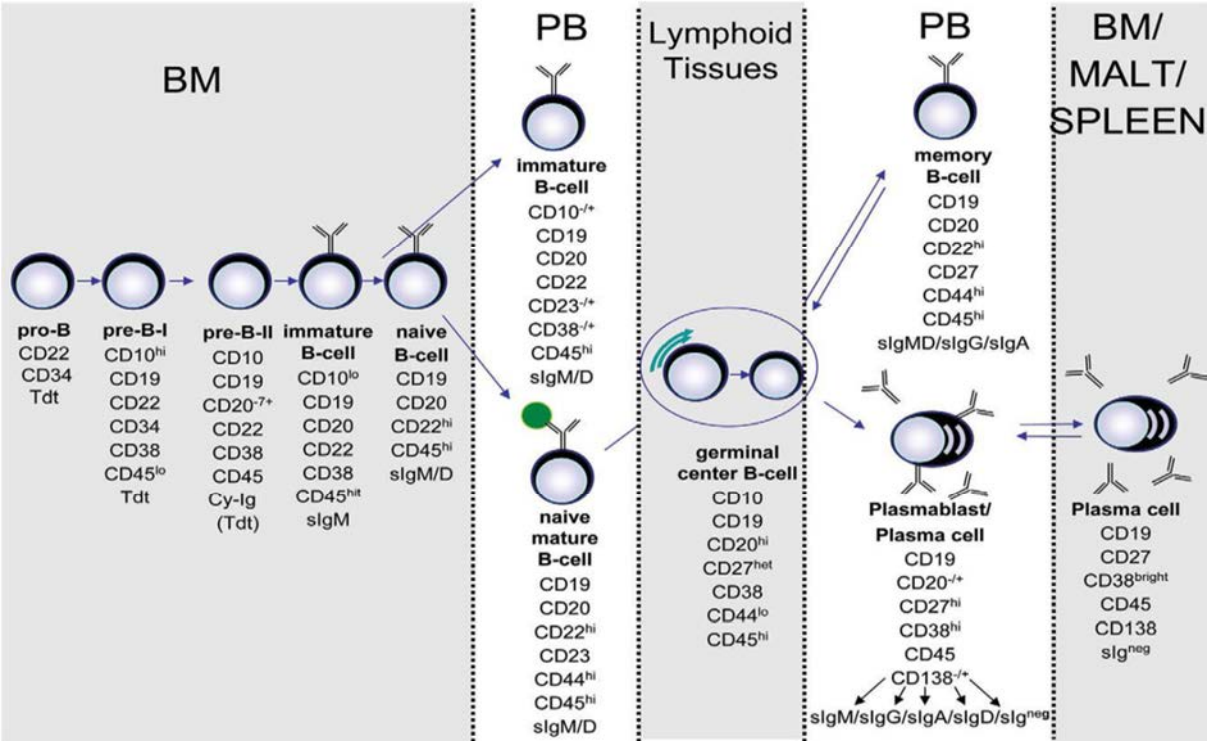


Figure 4 : Différentiation des lymphocytes B chez l'homme. La classification est effectuée selon les caractéristiques phénotypiques des différentes sous-populations (Perez-Andres et al., 2010).

3.2. La diversité du répertoire d'anticorps et la théorie de sélection clonale

Afin de remplir leur rôle d'importance dans l'immunité adaptative, les lymphocytes B doivent assurer la reconnaissance spécifique d'innombrables pathogènes. Ils s'acquittent de cette tâche grâce à la grande diversité de la spécificité de leurs récepteurs, les Ac membranaires. On réfère couramment à cette diversité comme le répertoire des Ac qui représente la variété totale d'Ac dont dispose l'organisme. Chaque individu possède une multitude de lymphocytes B dont chacun présente une spécificité unique. Ce concept « une cellule, un Ac » a été démontré par les travaux de Nossal et collaborateurs (Nossal, 2002) et constitue la première évidence de la théorie de la sélection clonale avancée par Burnet en 1957 (BURNET, 1957). Cette théorie, à la base de l'immunité adaptative, postule entre autres que chaque lymphocyte possède un récepteur de spécificité unique, que seulement les cellules exprimant un récepteur approprié pourront lier un Ag particulier avec une grande affinité, ce qui conduira à l'activation des lymphocytes qui se différencieront alors en cellules effectrices portant un récepteur de spécificité similaire à celui exprimé par la cellule dont ils dérivent (BURNET, 1957). Afin de

générer une telle diversité, il est inconcevable que tout le répertoire des Ac soit codé par des gènes distincts, puisqu'il faudrait plus de gènes pour coder ces récepteurs qu'il en existe dans le génome en entier. Pour contourner cette difficulté, une astuce génétique a été adoptée par l'organisme : on permet des modifications moléculaires dans le nombre restreint de gènes qui codent pour les Ac.

3.3. Le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse : les réarrangements génétiques et la tolérance au soi

Les réarrangements moléculaires amenés précédemment surviennent dans les gènes des Ig lors du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques. De multiples signaux solubles et membranaires, comme l'interleukine-7 (IL-7), le *stem cell factor* (SCF) et le *fms-like tyrosine kinase-3 ligand* (FLT-3L) produits ou présentés par les différents types de cellules stromales constituant cet environnement, sont nécessaires à leur génération (Nagasawa, 2006). La figure 5, reprenant les concepts présentés dans la revue de Ollila et collaborateurs (Ollila and Vihinen, 2005), illustre les différentes phases de ce processus de développement, au travers desquelles les gènes des Ig des cellules B subissent des modifications génétiques.

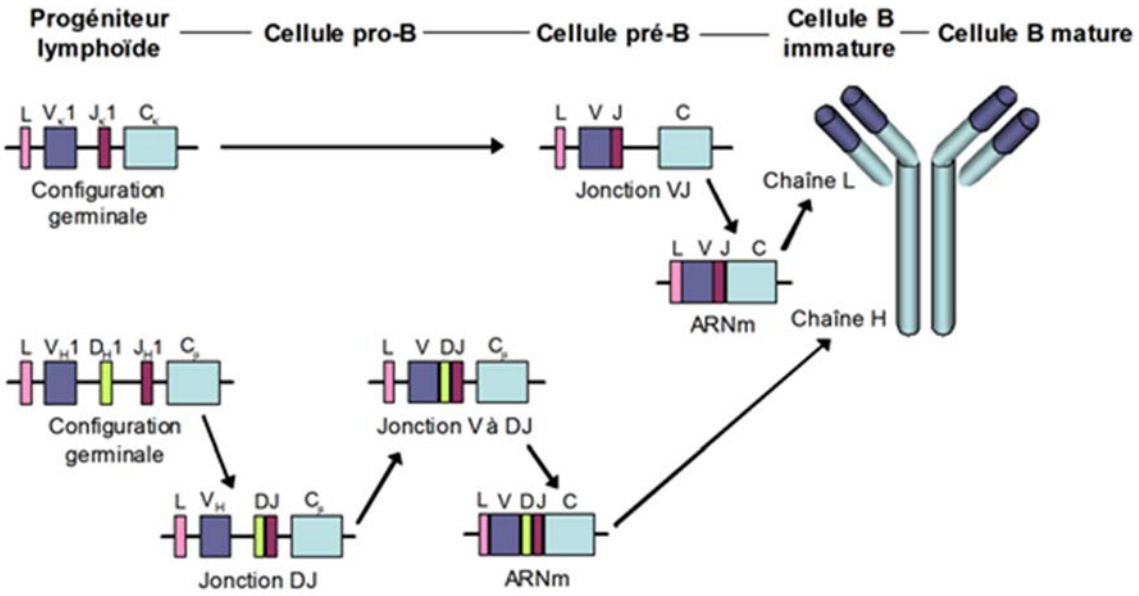


Figure 5 : Les stades du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse et les réarrangements moléculaires associés. Ce schéma reprend les concepts présentés en (Ollila et al., 2005). Pour la chaîne légère, uniquement les gènes du locus κ sont reproduits. Les abréviations présentées dans cette figure correspondent aux termes suivant : Chaîne L : chaîne légère; Chaîne H : chaîne lourde; L : séquence leader; V : segment de variabilité ; J : segment de jonction; D : segment de diversité; C : segment de région constante.

Au départ, uniquement la chaîne lourde des Ig est réarrangée à l'aide des enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2 et est exprimée fonctionnellement en surface des cellules pré-B à titre de pré-BCR, conjointement à une chaîne légère de substitution, VpreB ou λ5 (Geier and Schlissel, 2006). À cette étape, l'expression des protéines RAG est diminuée, les cellules prolifèrent et éliminent leur dépendance à l'IL-7 (Geier and Schlissel, 2006)). Par la suite, la chaîne légère des Ig est réarrangée toujours à l'aide des protéines RAG, ce qui conduit à l'expression d'un BCR de type IgM, unique et fonctionnel, en surface des cellules B dites « immatures » et à l'inactivation subséquente des recombinases (Geier and Schlissel, 2006).

Durant ces processus de réarrangement, on note une première perte majeure des cellules B, parce que seulement le tiers des cellules pourra procéder à un réarrangement productif de la chaîne lourde et qu'une fraction encore plus petite réussira un réarrangement productif de la chaîne légère (Su et al., 2004). Les cellules ne pouvant exprimé des Ig fonctionnelles mourront par apoptose et seront possiblement éliminées *in situ* par les macrophages (Su et al., 2004).

Malgré ces pertes cellulaires précoces, un nombre important de cellules B atteint tout de même chaque jour le stade dit immature, chiffré à 2×10^7 cellules chez la souris (Su et al., 2004) et estimé à $10^{10} - 10^{11}$ cellules chez l'humain (Banchereau and Rousset, 1992). Cependant, seulement 10 à 20% de ces cellules sortiront de la moelle osseuse, en vue de rejoindre la périphérie (Su et al., 2004). Cette seconde perte cellulaire est due à plusieurs « checkpoints » (tableau 1) que subit la cellule B pour éliminer les cellules autoréactives afin d'éviter qu'elles puissent engager une réponse immunitaire contre le soi une fois relarguées en périphérie (Yurasov et al., 2005). On décrit ce phénomène comme l'induction de la tolérance au soi.

Délétion clonale	**Anergie**	**Receptor Editing**
Sélection négative des LB auto-réactifs suite à une forte liaison de l'AC membranaire avec l'auto-Ag.	Faible liaison de l'AC membranaire avec l'auto-Ag. Les cellules passent dans la circulation pour être détruites au niveau de la Rate (Chung et al., 2003).	Recombinaison supplémentaire dans les gènes de chaine légère pour éliminer la spécificité autoréactive du récepteur en le remplaçant par un nouveau BCR non autoréactif (Pelanda and Torres, 2006).

Tableau 1 : différents « checkpoints » subis par les LB pour éliminer les cellules autoréactives.

En résumé, l'environnement de la moelle osseuse est le siège de la génération de cellules B porteuses d'un répertoire d'Ac diversifiés, tolérants au soi. Les cellules B ainsi générées, ayant survécu à cette étape de sélection négative, sont maintenant prêtes à être relarguées en périphérie. Contrairement à ce qu'on croyait il y a une dizaine d'années, les cellules relâchées sont toujours de type immature.

3.4. Les lymphocytes B transitionnels et leur maturation au niveau de la rate

Chez la souris et l'humain, on retrouve en circulation des lymphocytes B immatures, transitant de la moelle osseuse vers la rate, où ils achèveront leur développement en cellules matures dites naïves (Carsetti et al., 2004). Tout d'abord décrites et étudiées chez la souris, ces cellules immatures ont été appelées « transitionnelles » (*transitional B cells*) pour la première fois en 1995 par Carsetti et collaborateurs (Carsetti et al., 1995). Elles représentent 10 à 15% des cellules de la rate murine et possèdent une courte durée de vie, de 3 à 4 jours, qui représentent la période de temps nécessaire à leur maturation en cellules naïves (Su et al., 2004). Chez l'humain, ces cellules ont été quantifiées dans le sang et représentent 2% des lymphocytes B circulants (Dudley et al., 2005 ; Sims et al., 2005 ; Carsetti et al., 2004). Chez les deux espèces, ces cellules transitionnelles acquièrent l'expression des IgD en surface (Carsetti et al., 2004) en plus de celle des IgM, par un processus d'épissage alternatif d'un pré-acide ribonucléique messager (pré-ARNm) (Dudley et al., 2005). À partir du modèle murin, on suggère que dans la phase précoce de maturation dans la rate, les cellules B seraient sélectionnées négativement à la suite de la reconnaissance d'un Ag du soi et seraient éliminées par apoptose (Su et al., 2004). Ensuite, un processus plus tardif de sélection positive s'opérerait (Su et al., 2004), suivi (Srivastava et al., 2005) ou non (Allman et al., 2001) d'une phase de prolifération, permettant théoriquement d'augmenter la fréquence des cellules dont la spécificité serait potentiellement utile dans le répertoire mature de cellules B (Srivastava et al., 2005). Les signaux délivrés à ces cellules en maturation semblent cibler le BCR et/ou les récepteurs apparentés à la famille Toll (*Toll-like receptors*, TLR), dont la fonction première est de reconnaître et de répondre à des structures bactériennes spécifiques (Su et al., 2004).

Globalement, seulement 3 à 5% des lymphocytes B immatures générés dans la moelle osseuse rejoindront le réservoir de cellules matures de la périphérie (Jankovic et al., 2004; Srivastava et al., 2005) y demeureront en circulation de 80 à 120 jours (Cancro, 2004). Les cellules B n'interagissant jamais avec leur Ag seront éliminées par apoptose et remplacées par de

nouvelles cellules B matures (Gaudin et al., 2004). Ce processus de remplacement cellulaire équilibré représente bien l'homéostasie du réservoir périphérique chez l'individu sain dont la taille globale ainsi que les proportions des sous-populations cellulaires sont maintenues constantes malgré les changements s'y opérant (Gaudin et al., 2004). Ce réservoir de cellules B renferme le répertoire primaire des Ac dont les spécificités ont été établies avant la réponse à un Ag étranger et qui servira à monter adéquatement les réponses immunitaires futures.

4 La réponse des lymphocytes B matures aux différents types d'Ag

On classe les agents étrangers pouvant induire une réponse immunitaire en différentes catégories, suivant la manière avec laquelle ils peuvent engendrer une activation des cellules B, traduite par une prolifération cellulaire et la production d'Ac. On peut catégoriser ces agents soit en Ag indépendants du thymus, dits T-indépendants de type I ou II, soit en Ag T-dépendants. Les premiers pourront enclencher seuls l'activation des lymphocytes B, alors que les seconds nécessiteront l'aide spécifique des lymphocytes T.

4.1. La réponse des lymphocytes B aux Ag T-indépendants de type I

Les Ag T-indépendants de type I sont couramment appelés mitogènes, puisqu'ils ont la capacité intrinsèque d'induire la mitose des cellules. À de fortes concentrations, ils peuvent stimuler de multiples cellules B à la fois, phénomène auquel on réfère en tant que stimulation polyclonale (Vos et al., 2000). Le pouvoir de ces Ag à agir sur plus d'une cellule B réside dans leurs sites de liaison qui sont indépendants du BCR. Entre autres, ces molécules font entrer en jeu les TLR, dont la stimulation enclenche une cascade d'activation qui mènera éventuellement à la production d'Ac (Peng, 2005). Les lipopolysaccharides (LPS) retrouvés dans les parois bactériennes sont un exemple de cette catégorie d'Ag (Vos et al., 2000), que les cellules B pourront rencontrer, comme les autres types d'Ag, au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Autant les lymphocytes B matures qu'immatures peuvent répondre à ce type de stimulation, ce qui n'indique aucune préférence au niveau de la population cible. Les cellules ainsi activées semblent contribuer au maintien des niveaux d'Ac dans le sérum, bien que la voie de différenciation empruntée par ces dernières demeure encore obscur (Manz et al., 2005).

4.2. La réponse des lymphocytes B aux Ag T-indépendants de type II

Les Ag T-indépendants de type II, de leur côté, n'ont pas la capacité intrinsèque d'activer les lymphocytes B (Weintraub, 2003). Ils agissent sur les cellules B spécifiquement via le BCR en induisant sa multimérisation (Vos et al., 2000). Le regroupement d'un minimum de 10 à 20 molécules d'Ac de surface semble critique pour l'activation des cellules, suivi du recrutement d'un récepteur supplémentaire, comme celui du récepteur du complément 2, aussi connu sous le nom de *Cluster of differentiation* 21 (CD21) et qui est également le récepteur à l'EBV (Jeurissen et al., 2004). Bien que cette réponse ne nécessite pas l'aide spécifique des cellules T, il semble que des signaux secondaires provenant de ces cellules pourraient tout de même être requis (Jeurissen et al., 2004). Les cellules B répondant à ce type d'Ag reçoivent également l'aide des cellules dendritiques (DC) du sang ayant capturé l'Ag, principalement via la production de facteurs comme le *B Lymphocyte Stimulator* (BLyS)/BAFF et/ou *A Proliferation-Inducing Ligand* (APRIL) (Balázs et al., 2002). Cette interaction influence directement la survie des cellules B répondantes et leur différenciation en cellules sécrétrices d'Ac, appelées plasmocytes (Balazs et al., 2002), par une voie extrafolliculaire (Shapiro-Shelef and Calame, 2005) qui sera abordé plus loin. Les Ag responsables de cette réponse sont de haut poids moléculaire et possèdent des structures répétitives, généralement polysaccharidiques, comme on en retrouve fréquemment dans la capsule de bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* (Weintraub, 2003). Bien qu'il soit généralement admis que ces Ag ne génèrent pas de mémoire immunologique comme les Ag T-dépendants, il a récemment été démontré qu'ils pourraient induire la génération de lymphocytes B mémoires chez la souris (Obukhanych and Nussenzweig, 2006), ainsi qu'une protection à plus long terme de l'organisme par la production d'Ac sériques spécifiques, autant chez la souris que chez l'humain (Obukhanych and Nussenzweig, 2006; Welsh et al., 2004).

4.3. La réponse des lymphocytes B aux antigènes T-dépendants

Les Ag T-dépendants sont de nature protéique (protéines solubles ou peptides) et sont désignés ainsi car les lymphocytes B nécessitent la collaboration des lymphocytes T pour monter une réponse humorale efficace (Mond et al., 1995). La majorité des cellules B répondant à ce type d'Ag sont dites conventionnelles (ou folliculaires) et font partie de la catégorie B2. La contribution des cellules B des MZ ne peut cependant pas être exclue (Lopes-Carvalho et al., 2005). Ces dernières possédant une capacité supérieure à celle des

cellules B folliculaires à activer les lymphocytes T $CD4^+$ chez la souris (Attanavanich and Kearney, 2004) et pouvant également former des CG, acquérir des mutations somatiques, exprimer des Ig de haute affinité et préserver une mémoire immunologique comparable à celle des cellules folliculaires dans ce type de réponse (Song and Cerny, 2003). En fait, la mémoire immunologique engendrée par les cellules B des MZ pourrait être jugée plus importante que celle des cellules B conventionnelles, car en plus de monter une réponse secondaire IgG, les cellules B des MZ seraient les seules à générer une réponse secondaire IgM (Song and Cerny, 2003).

Une fois le contact lymphocyte B - Ag établi, un premier phénomène de coopération lymphocyte B – lymphocyte T s'installe. Elle découle d'une interaction spécifique à l'Ag de la part des deux types cellulaires, bien qu'ils ne reconnaissent pas exactement la même structure antigénique, appelée épitope (Mitchison, 2004). La clonalité des récepteurs des cellules B et T et le fait que l'Ag représente le lien qui les unisse impliquent que de très rares cellules spécifiques (environ 1 sur un million) devront entrer en contact (Mitchison, 2004). Encore aujourd'hui, il est peu clair comment ces cellules rejoignent leur Ag et se rencontrent pour monter une réponse (Okada and Cyster, 2006). On suppose que leur recrutement et leur maintien dans un environnement particulier reposent sur le pouvoir d'attraction des chimiokines qui sont présentes différentiellement dans les tissus et sont reconnues par des récepteurs spécifiques exprimés sur les cellules cibles (Stein and Nombela-Arrieta, 2005).

En plus de générer, comme lors des réponses T-indépendantes, une première vague de plasmocytes dont la majorité est à courte vie (via la réponse extrafolliculaire), les réponses T-dépendantes ont la capacité d'induire une mémoire immunologique classique (Weintraub, 2003), grâce à la génération de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes dits à longue vie. Ces deux types de cellules « mémoires » sont issus de la réaction des CG, au sein desquels un second phénomène de coopération lymphocyte B – lymphocyte T prend place. La réponse à ce type d'Ag est soi-disant la seule à conduire à la production d'Ac de haute affinité pour l'Ag par le processus génétique d'hypermutation somatique des gènes des Ig. Avec les avancées récentes touchant les réponses T-dépendantes, on envisage toutefois une modification éventuelle de cette assertion. Néanmoins, les Ac ainsi modifiés contribuent à augmenter la diversité du répertoire d'Ac établi précédemment durant la génération du réservoir de lymphocytes B matures.

4.3.a. L'initiation de la réponse des lymphocytes B naïfs

À l'initiation de la réponse primaire T-dépendante, les lymphocytes B naïfs recevront principalement deux signaux : le premier dérivera de leur rencontre avec l'Ag correspondant à leur spécificité uniquement et le second proviendra de leur premier contact avec un lymphocyte T spécifique.

4.3.a.i. Le recrutement des Ag et des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires

Anatomiquement, la rencontre des lymphocytes B et des Ag s'amorce au sein d'un organe lymphoïde secondaire comme les ganglions, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour *Mucosal-associated lymphoid tissue*), qui incluent entre autres les amygdales et les plaques de Peyer (Drayton et al., 2006). Ces structures sont spécialisées dans la capture et la concentration des particules étrangères, à travers lesquelles les cellules B recirculent continuellement (Drayton et al., 2006). Les Ag peuvent pénétrer ces structures sous forme soluble, sous forme de complexe immun ou bien déjà en association avec des DC qui les auront captés au niveau des différentes surfaces épithéliales avant de migrer, par exemple, aux ganglions (Okada and Cyster, 2006).

Les vaisseaux lymphatiques afférents sont majoritairement responsables de l'entrée des Ag et des DC au niveau du ganglion, alors que les veinules post-capillaires à endothélium épais, connues sous le nom de *High endothelial venules* (HEV), sont spécialisées dans l'extravasation exclusive des lymphocytes (B et T) du sang vers les ganglions (Miyasaka and Tanaka, 2004). Les DC activées par l'Ag qui entrent dans le ganglion vont majoritairement se loger dans la zone riche en lymphocytes T à proximité des HEV, où elles pourront exercer leur fonction première, c.-à-d. présenté des Ag aux cellules T (Miyasaka et Tanaka., 2004). La migration dirigée des DC, des lymphocytes T et B dans cette structure est dépendante de la capacité de chacune des populations à répondre à l'attraction des chimiokines *CC-chemokine ligand 19* (CCL19), CCL21 et *CXC-chemokine ligand 13* (CXCL13) (Miyasaka et Tanaka., 2004), dont la présence est illustrée dans la figure 6, représentant l'organisation structurale d'un ganglion lymphatique.

Dans cet environnement, les lymphocytes B spécifiques sont traditionnellement activés par la liaison de leur BCR soit avec la forme soluble de l'Ag, soit avec sa forme complexée (Ag-Ac) présentée en surface des cellules dendritiques folliculaires (FDC) (Okada et Cyster., 2006). Récemment, la contribution supplémentaire des DC à l'activation spécifique des lymphocytes B a été mise en évidence, où la forme native de l'Ag pourrait être présentée en complexe à la

surface des DC (Qi et al., 2006) via un mécanisme d'endocytose impliquant le récepteur FcγRIIB (Okada et Cyster., 2006). Ce processus de présentation des Ag diffère de ce qui est observé dans le cas de l'activation des cellules T où les Ag sont obligatoirement dégradés avant de retourner en surface. Une fois le BCR multimérisé à la suite du contact avec l'Ag, une signalisation intracellulaire s'enclenche chez la cellule B favorisant l'internalisation du complexe Ag – Ac (Clark et al., 2004). L'Ag est ensuite dégradé en fragments peptidiques avant de retourner en surface de la cellule B au sein d'un autre complexe, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (Clark et al., 2004). Ce processus de reconnaissance antigénique modifie la réponse de la cellule B aux chimiokines en variant l'expression de récepteurs spécifiques, ce qui dirige la poursuite de leur migration dans le ganglion vers la zone folliculaire (Garside et al., 1998)(Miyasaka et Tanaka., 2004).

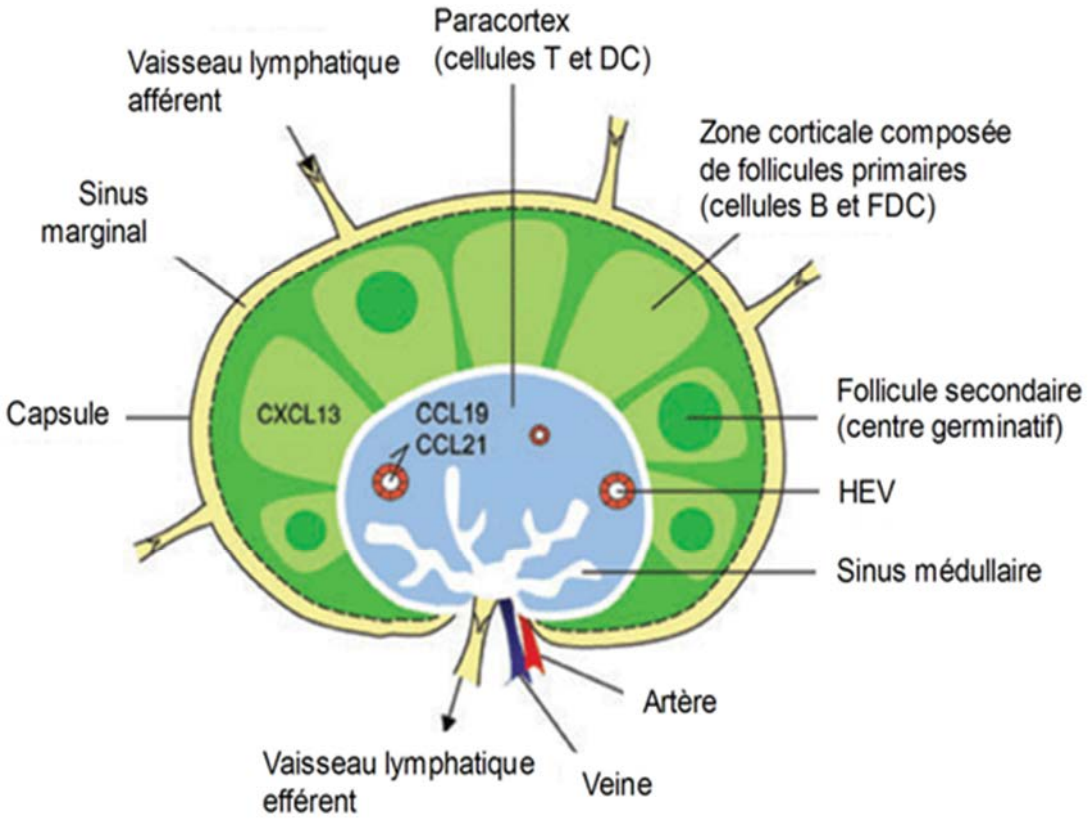


Figure 6 : La structure d'un ganglion lymphatique (Drayton et al., 2006).

4.3.a.ii. La première interaction spécifique lymphocytes B naïfs – lymphocytes T

Les lymphocytes B sont maintenant prêts à coopérer une première fois avec des lymphocytes T spécifiques via une interaction entre le TCR de la cellule T et les complexes peptide – CMH II présentés en surface de la cellule B. Cette rencontre se produira à la frontière de la zone folliculaire et de la zone de cellules T (Okada et Cyster., 2006), 2 à 3 jours (interaction précoce T-B) après l'entrée de l'Ag dans l'organisme (Garside et al., 1998). Les cellules T destinées à assister les lymphocytes B dans leur réponse, sont connus sous le nom de cellules T auxiliaires (T_H pour *T helper*) et se caractérisent par l'expression du récepteur CD4 en surface (Chaplin, 2006), qui joue un rôle de corécepteur stabilisateur pouvant lier les molécules de CMH II en surface de la cellule B (Chaplin, 2006). En vue de cette interaction, les cellules T auront été au préalable activées par une cellule présentatrice d'Ag (APC) à la suite, entre autres, de la liaison du TCR avec les complexes peptides - CMH II qu'elles portent (Gogolák et al., 2003) et de l'interaction du CD154 (sur la cellule T) avec le CD40 (sur la CPA) (Crawford et al., 2006).Tel que mentionné précédemment, les APC possédant cette fonction sont traditionnellement les DC, bien qu'une contribution additionnelle des lymphocytes B dans ce processus précoce a récemment été montrée comme essentielle chez la souris (Crawford et al., 2006). La reconnaissance de l'Ag par la cellule T résultera en son activation, sa multiplication et sa maturation en différentes sous-populations de cellules effectrices, dont des lymphocytes T auxiliaires du type T_H1 ou T_H2 (Kim, 2005). Habituellement, les cellules du type T_H1 sont médiatrices de l'immunité cellulaire contre les bactéries et les virus intracellulaires et les cellules T_H2 participent à l'immunité humorale ainsi qu'à la réponse contre les parasites extracellulaires (Lee et al., 2006). La première interaction spécifique cellule B – cellule T impliquerait autant des cellules T_H1 que T_H2, qui se distinguent par le patron de cytokines qu'elles sécrètent : la production d'interféron γ (IFN -γ) étant réservée aux T_H1, alors que la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 étant associée aux T_H2 (Stetson et al., 2004; Vinuesa et al., 2005). Comme le fait l'Ag par sa nature, les différentes cytokines produites influenceront la commutation isotypique des cellules B en favorisant l'expression d'une classe ou d'une sous-classe d'Ig particulière (Vinuesa et al., 2005). Durant la différenciation des cellules T en T_H2, la première cytokine produite est l'IL-4, dont la présence est nécessaire à leur polarisation et par la suite, cette polarisation (Ansel et al., 2006) ainsi que la survie des cellules (Pulendran and Ahmed, 2006) sont renforcées par la production d'IL-2, normalement réservée aux cellules du type T_H1 (Stetson et al., 2004). De l'IL-4 serait également produite par les lymphocytes T à la suite de l'interaction avec les

cellules B spécifiques, sans stimulation via le CD154 (Cunningham et al., 2004) qui survient plus tard.

Une fois le contact cellule B – cellule T activée établi via les interactions peptide-CMH II - TCR et CMH II - CD4, des signaux supplémentaires sont nécessaires à la poursuite de la réponse. Entre autres, on note la contribution de quatre couples récepteurs – ligands, CD72-CD100, CD154-CD40, CD86-CD28 et *B7 related-protein* 1- *inducible costimulator* (B7 RP 1-ICOS), dont les récepteurs se retrouvent sur les cellules B et les ligands sur les cellules T (Bernard et al., 2005).

Globalement, à l'issue de la première interaction T-B, les cellules B pourront soit migrer dans la zone folliculaire et élaborer un CG, soit migrer dans la zone extrafolliculaire (sinus médullaire du ganglion ou pulpe rouge de la rate) et monter rapidement la première réponse Ac dite extrafolliculaire par la génération de plasmocytes à courte vie (MacLennan et al., 2003). La résultante de cette première interaction est schématisée dans la figure 7, tirée de (Vinuesa et al., 2005).

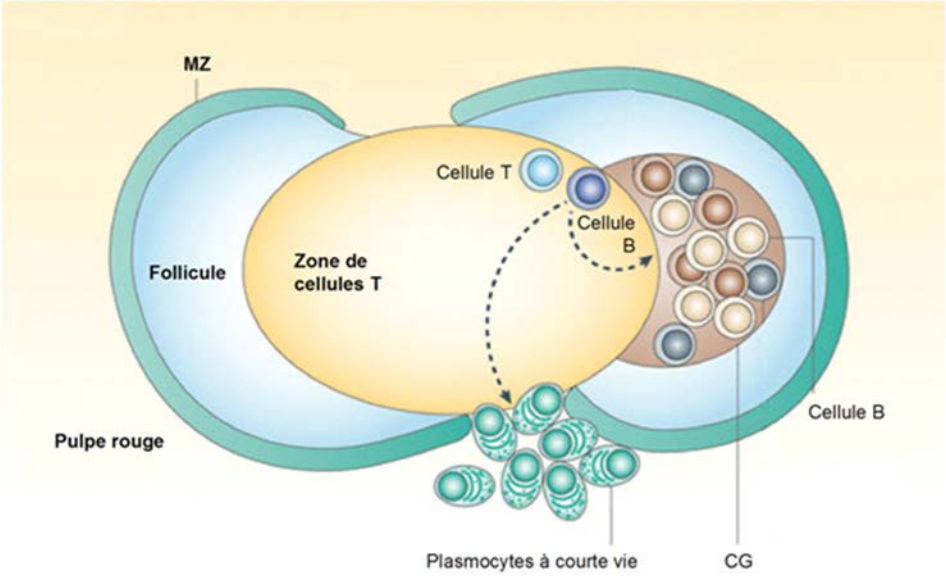


Figure 7 : Schématisation de l'aboutissement de la première rencontre B–T au niveau de la rate chez la souris. On y représente la décision de rejoindre la voie extrafolliculaire et de former des plasmocytes à courte vie ainsi que celle de former un CG au niveau de la zone folliculaire (Vinuesa et al., 2005).

L'engagement dans la voie extrafolliculaire ou celle des CG semble dépendre de l'intensité de stimulation du CD40 (Erickson et al., 2002) et de la force du signal reçu par le BCR, qui elle même dépend de l'affinité du récepteur pour l'Ag (Paus et al., 2006). Les cellules de plus haute affinité seraient recrutées préférentiellement dans la voie extrafolliculaire assurant ainsi

une réponse Ac rapide et spécifique (Paus et al., 2006). Au niveau transcriptionnel, des facteurs clés sont connus comme dirigeant exclusivement les cellules dans l'un ou l'autre des voies : par exemple, l'induction de l'expression du *B lymphocyte-induced maturation protein-* 1 (BLIMP-1) engage les cellules dans la voie extrafolliculaire des plasmocytes, alors que l'augmentation de l'expression de Bcl-6 les dirige dans la voie des CG (MacLennan and Vinuesa, 2002). *In vivo*, bien que la réaction des CG s'établisse et se complète après la réponse Ac extrafolliculaire, on l'abordera tout de même ici en premier, à cause de sa complexité.

4.3.b. Les CG et leur fonction

La réaction des CG se définit comme étant le cycle d'activité cellulaire et de changements moléculaires qui régulent l'évolution clonale des cellules spécifiques durant le développement des cellules B mémoires (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a). En d'autres mots, la réaction du CG permet d'amplifier la population cellulaire spécifique à l'Ag, d'augmenter son affinité pour ce dernier et de ne sélectionner que les cellules les plus affines pour monter le réservoir de cellules mémoires et de plasmocytes effecteurs.

4.3.b.i. L'expansion et la sélection des lymphocytes B

Chez la souris, l'initiation de chaque CG implique le recrutement de 1 à 3 cellules B spécifiques dans la zone folliculaire (McHeyzer-Williams et al., 2001). Ces cellules connaissent alors une expansion, à un point tel que le CG pourra contenir environ 10^4 cellules B à sa taille maximale, atteinte après 10-12 jours suivant le début de la réponse primaire (McHeyzer-Williams et al., 2001). C'est ce foyer de cellules en prolifération que l'on nomme CG et qui constitue le follicule dit secondaire au sein du follicule primaire (zone folliculaire), comme on peut l'observer dans la figure 8. Les zones claire et foncée constituent le CG, alors que la zone du manteau représente soit les cellules résidentes du follicule primaire qui ont été repoussées durant l'initiation du CG soit les cellules B non réactives (Wolniak et al., 2004).

Dès l'initiation du CG, les lymphocytes B, exprimant des Ig en configuration germinale, entrent en prolifération rapide. Ces cellules portent alors le nom de centroblastes et se situent dans la zone foncée du CG (McHeyzer-Williams et al., 2006). Le processus d'hypermutation somatique se met alors en jeu, induisant dans les gènes des Ig une mutation par division cellulaire (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a), ce qui implique une fréquence de $1x10^{-3}$ base mutée par génération (Notarangelo et al., 2006). Par la suite, les cellules exprimeront des Ig à l'affinité modifiée, cesseront de se diviser et migreront dans la zone claire des CG au sein de laquelle elles seront appelées centrocytes (McHeyzer-Williams

et al., 2006). C'est sur la base de la nouvelle affinité que présente l'Ac de surface pour l'Ag que les cellules seront une nouvelle fois sélectionnées (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a). Les FDC, retrouvées en grande concentration dans cette zone des CG, maintiennent en surface les Ag natifs sous forme de complexes immuns et les exposent ainsi aux lymphocytes B (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a; Park and Choi, 2005). Les cellules possédant les affinités les plus faibles pour l'Ag meurent par apoptose *in situ*, alors que celles possédant les plus hautes affinités sont sélectionnées positivement (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a). Bien que ce mécanisme de compétition ne soit pas clairement défini (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a), on croit que les cellules seraient initialement programmées à mourir, à moins qu'elles ne reçoivent des signaux positifs de survie.

L'implication directe des FDC au niveau de la liaison BCR - Ag demeure à être démontrée (Manser, 2004; Park and Choi, 2005). Plusieurs cycles de sélection – maturation d'affinité peuvent ensuite se succéder, jusqu'à ce que la différenciation des cellules en plasmocytes ou en cellules mémoires soit induite (Manser, 2004). En absence de stimulation antigénique supplémentaire, le CG disparaîtra après 21 jours suivant le début de l'infection (McHeyzer-Williams et al., 2001). Même si les événements décrits précédemment prennent majoritairement leur source de l'étude du modèle murin, ces derniers semblent bien s'appliquer au modèle humain, où les travaux sont souvent confinés à l'étude de tissus inflammés (Wolniak et al., 2004). Chez les deux espèces, on retrouve une morphologie classique comparable des CG (Wolniak et al., 2004) définie par des sous-populations distinctes regroupées en zones (Manser, 2004) similairement à celle illustrée à la figure 8.

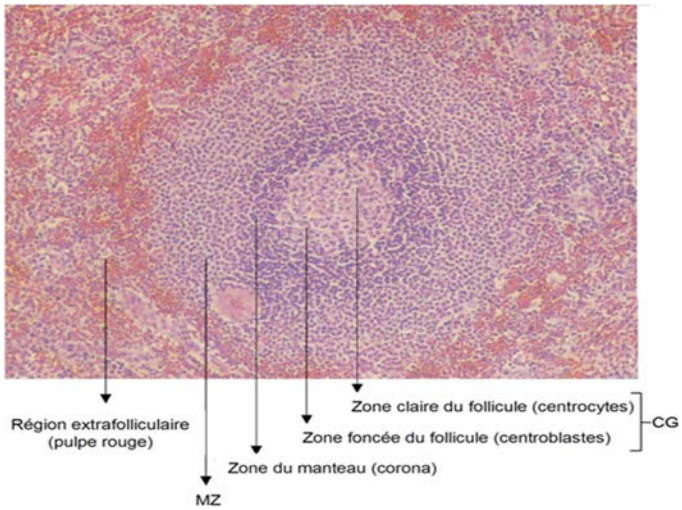


Figure 8 : Structure micro-anatomique de la zone folliculaire d'une rate de souris, montrant la structure d'un follicule secondaire, que l'on nomme CG (Sagaert and De Wolf-Peeters, 2003).

Tel qu'abordé précédemment, la seconde interaction T-B via la liaison du CD40 avec le CD154 se déroule au niveau de la réaction du CG. À cette étape, l'aide des cellules T est requise pour la progression de cette réaction (Manser, 2004), dont la sélection des cellules B (McHeyzer-Williams et al., 2006) et la différenciation en plasmocytes (Moser et al., 2006). La sous-population de cellules T destinée à cette coopération diffère toutefois de celle(s) impliquée(s) lors de la première interaction T-B (voir section 4.3.aii). En effet, cette sous-population particulière de cellules T, appelée « cellules T folliculaires aidant les B » (pour *follicular B helper T cells* ou T_{FH} (Breitfeld et al., 2000) se retrouve uniquement dans l'environnement des CG, autant chez la souris que chez l'humain, et aurait comme rôle d'aider les lymphocytes B à se différencier en cellules mémoires et en plasmocytes (Vinuesa et al., 2005). Ces cellules, auxquelles on peut aussi référer en tant que cellules T des CG (*germinal center helper T cells*), se situent principalement dans la zone du manteau ainsi qu'à proximité et dans la zone claire des CG (Vinuesa et al., 2005). Elles ont été récemment définies par l'expression de $CXCR5^{high}$, $ICOS^{high}$ (pour inducible costimulator, une molécule de co-stimulation T de la famille du CD28 qui favorise particulièrement la production de l'IL-10 par les lymphocytes T), $PD1^{high}$, $BTLA^{high}$, $CD200^{high}$, $SLAM^{low}$, CXCL13 et CD40L (Johnston et al., 2009). Le développement des TFH est médié par l'IL-6 et l'IL-21, mais est indépendant des voies Th1, Th2 et Th17 (Nurieva et al., 2009, 2008; Vogelzang et al., 2008). Cette avancée met en évidence que les cellules B nécessitent l'aide de différentes sous-populations de lymphocytes T pour monter une réponse, expliquant ainsi le dogme réservant principalement aux cellules T_H2 cette fonction (Vinuesa et al., 2005). La figure 9, tirée de (Vinuesa et al., 2005), suggère deux voies pouvant mener à la génération des T_{FH}, qui sont mis en relation avec la réponse extrafolliculaire et celle des CG des cellules B.

Chez l'humain, les T_{FH} interagissent avec les lymphocytes B via l'interaction CD40-CD154 (Vinuesa et al., 2005). Cette interaction contribuerait à fournir une aide optimale aux lymphocytes B au niveau de la production d'Ac de tous les isotypes, de l'induction de l'expression de l'enzyme nécessaire à la commutation isotypique (AID pour *activation-induced cytidine deaminase* ou *activation-induced deaminase*) et de la commutation proprement dite (Kim et al., 2005). Également, cette interaction est nécessaire au maintien des CG, puisque son blocage conduit à la dissolution de cette structure (Vinuesa et al., 2005). On assume généralement que le contact CD40-CD154 est requis pour le processus d'hypermutation somatique qui se déroule normalement dans les CG, tel que le suggère l'expression de AID (Kim et al., 2005) et les études antérieures portant sur la caractérisation

des cellules de patients atteints du Syndrome Hyper-IgM relié au chromosome X (Durandy et al., 2005). Habituellement, ces études font état d'une absence de mutations dans les gènes des Ig, que l'on associe à un défaut de l'interaction CD40-CD154. L'une d'entre elles tend aussi à associer l'expression partielle du CD154 à la présence surprenante de mutations chez un patient (Razanajaona et al., 1996). Cependant, des études plus récentes montrent un niveau de mutations significatif dans les gènes des Ig de tels patients, bien que la liaison CD40-CD154 soit clairement compromise (Brezinschek et al., 2000; Weller et al., 2001). On suggère alors que l'origine de ces mutations pourrait être T-indépendante plutôt que T-dépendante ou bien le fruit d'une seconde voie de diversification (Durandy, 2002).

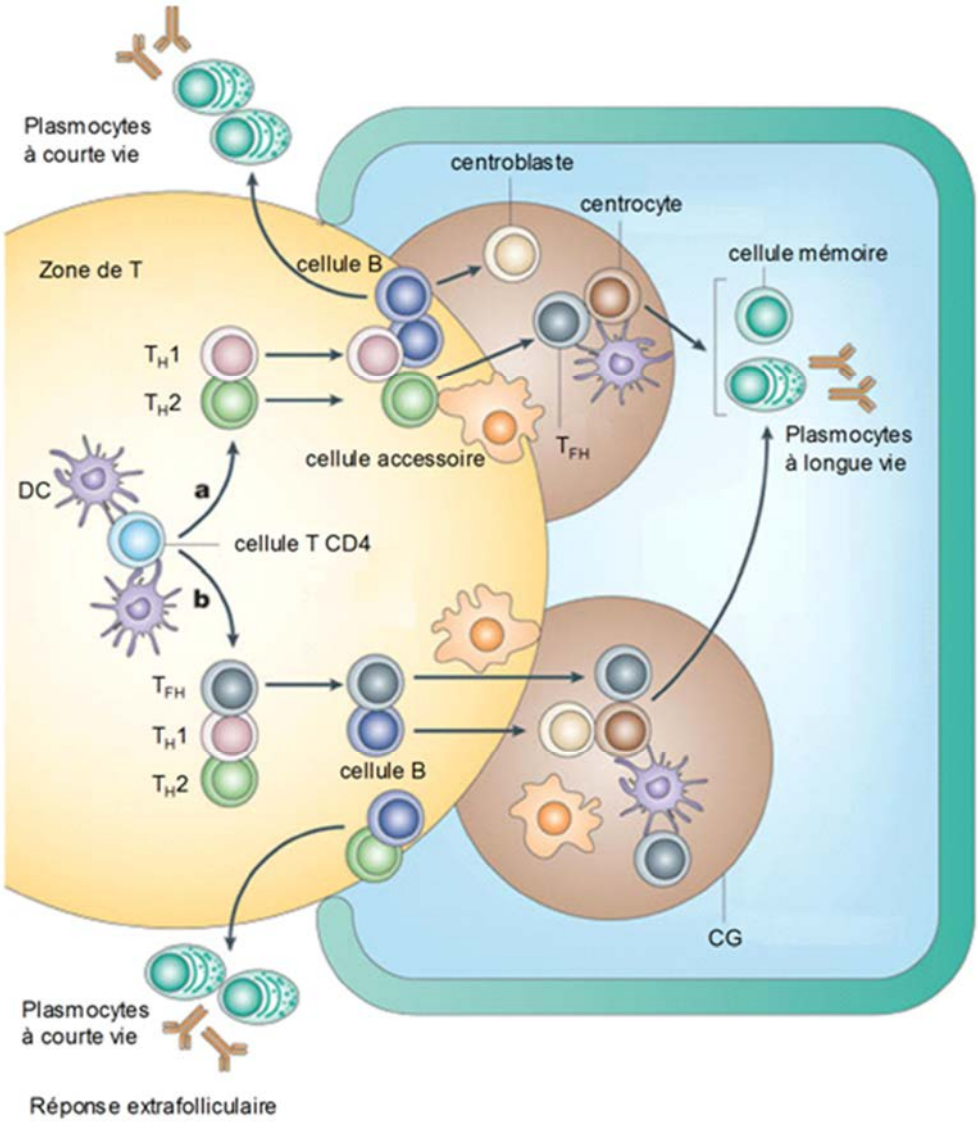


Figure 9 : voies possibles conduisant à la génération des T_{FH}. Deux avenues (a et b) sont présentées, en parallèle avec les étapes décrivant la réponse des lymphocytes B aux Ag T-dépendants. Il n'est pas clair si les T_{FH} proviennent directement de l'activation et de la polarisation des cellules T stimulées par l'Ag (b) ou bien si elles dérivent de cellules T_H2 en différenciation ayant migré dans la zone folliculaire (a) (Vinuesa et al., 2005).

Chez la souris, les cellules T_{FH} ont la capacité de produire de grandes quantités d'IL-10 (McHeyzer-Williams et al., 2006) comme on le soupçonne aussi chez l'humain (Kim et al., 2005; Vinuesa et al., 2005). Les T_{FH} produisent également de l'IL-21 (Chtanova et al., 2004), pour laquelle la majorité des cellules B des amygdales expriment le récepteur, en plus grande abondance sur les cellules naïves que mémoires (Chtanova et al., 2004). L'IL-21 jouerait un rôle important au niveau de la commutation isotypique des cellules B et de leur différenciation en plasmocytes (Ettinger et al., 2005). On rapporte également la production d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-10 dans cet environnement, dont les cellules T activées seraient la source (Park and Choi, 2005). L'IL-4 dirigerait la différenciation des cellules B des CG vers le stade de cellules mémoires, l'IL-10 vers le stade de plasmocytes, alors que l'IL-2 synergiserait avec l'IL-4 et l'IL-10 pour favoriser la prolifération cellulaire (Park et Choi., 2005). La contribution des FDC à ces événements de la réponse n'est toutefois pas exclue, particulièrement en ce qui concerne la survie des cellules et leur prolifération (Park et Choi., 2005).

4.3.b.ii. Les changements moléculaires se déroulant dans les CG

Chez l'homme, durant la réaction des CG, deux modifications majeures surviennent au niveau des gènes des Ig visant à modifier la fonction ou l'affinité des Ac produits par les cellules B. On réfère à ces deux changements en tant que commutation isotypique (*isotype switching*) et hypermutation somatique, respectivement. L'enzyme responsable des changements moléculaires a été récemment identifiée et porte le nom d'AID (Muramatsu et al., 2000). La commutation isotypique requiert la présence du contact direct avec la cellule T CD4+ spécifique du même antigène (interaction CD40-CD40L). Les souris $CD40L^{-/-}$ ne présentent aucune activité de l'AID (Cunningham et al., 2004). Le signal CD40L peut être renforcé par d'autres signaux comme l'action du BAFF (Litinskiy et al., 2002). L'implication de la voie CD40L dans la CSR est confirmée par l'existence de déficits immunitaires sévères, liés à l'absence d'expression du CD40L, avec une hyperprodution d'IgM et un déficit de tous les autres isotypes (syndrome XHIM). Les individus atteints de ce syndrome ne forment pas de centres germinatifs et n'ont pas de cellules B mémoires (Allen et al., 1993; DiSanto et al., 1993; Korthäuer et al., 1993). Un déficit similaire est observé chez les souris $CD40L^{-/-}$ ou $CD40^{-/-}$ (Kawabe et al., 1994; Renshaw et al., 1994). Chez ces souris, on peut cependant remarquer une réponse Ac normale aux antigènes TI, avec production normale d'IgG1, d'IgG3 et d'IgA. Ces résultats montrent le rôle essentiel du signal CD40 pour la CSR induite par la coopération T-B au cours d'une réponse TD. La molécule CD40L soluble induit, en synergie avec l'IL-4, la prolifération des cellules B et la CSR vers IgG1 et IgE (Stavnezer,

2000). La voie CD40 peut être inhibée par l'interaction de CD30 (exprimée par le lymphocyte B activé) avec son ligand CD30L (exprimé par le lymphocyte T activé) (Cerutti et al., 1998).

De même, la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T $CD4^+$ permet d'orienter la commutation isotypique vers l'un ou l'autre des isotypes d'Ig. L'IL-4 induit la production d'IgG1 et IgE et inhibe celles d'IgG3 et IgG2b (Coffman and Carty, 1986; Layton et al., 1984). Chez les souris $IL4^{-/-}$, IgE est totalement absente même après infection par des helminthes. Il n'en est pas de même pour IgG1 dont la quantité produite est fortement inhibée dans un contexte TD indiquant l'existence d'autres signaux capables d'activer la CSR vers IgG1 (Kühn et al., 1991). L'IL-4 et IFN-γ sont des antagonistes (Coffman and Carty, 1986). L'addition d'IFN-γ inhibe la CSR vers IgG1 et IgE dans les cellules B de souris stimulées par le LPS et IL-4 (Berton et al., 1989). En revanche, l'addition IFN-γ induit la commutation vers IgG2a dans les cellules B stimulées pas le LPS (Collins and Dunnick, 1993). L'IFN-γ inhibe également la production d'IgG3 dans les cellules B stimulées par le LPS (Coffman et al., 1986). Chez des souris déficientes pour le récepteur de l'IFN-γ on observe une réduction des réponses IgG2a et IgG3 (Huang et al., 1993). Le TGF-β (Transforming growth factor-β) favorise la CSR vers IgA, surtout quand il agit en synergie avec IL-2 et IL-5 (Coffman et al., 2009). Une isoforme du TGF-β, le TGF-β1, est également impliqué dans la CSR vers IgG2b (McIntyre et al., 1993).

Chez la souris, l'IL-5, impliquée dans la différentiation B, conduit, indépendamment de l'IL-4, à une augmentation du nombre des plasmablastes à IgG1 (Mizoguchi et al., 1999). L'IL-23 stimule la production de l'IgG1, de l'IgG2b et surtout de l'IgG3 (Ooi et al., 2009).Chez l'homme, l'IL-10 stimule la CSR vers IgG1 et IgG3 des cellules B stimulées par le LPS (Brière et al., 1994; Shparago et al., 1996). En revanche, l'IL-10 inhibe fortement CSR vers IgA dans des cellules activées par une combinaison de LPS, IL-4, IL-5 et TGF-β. *In vivo,* il est clair que le jeu de toutes les cytokines est rendu plus complexe par l'association de leurs effets directes et indirectes, notamment par le rétrocontrôle des cytokines de type Th1 (IL-2, IFN-γ..), par les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10, IL-13…) et inversement. En plus des cytokines, les signaux issus des contacts directes de type « cognate » entre cellules T et B sont impliqués dans la CSR.

Pour conclure, une fois que la DC est activée par l'Ag, elle contribue, à l'aide des cytokines à l'activation de la voie Th1, Th2 ou Th17. Ces cellules T vont activer à leur tour les cellules B qui vont se différencier en plasmocytes sécrétant des sous classes des Ig selon la voie

d'activation par les Th. Si c'est la voie Th1, les plasmocytes sécrètent des IgG2a et IgG3. Dans le cas de la voie Th2, sécrétion des IgG1, IgG2a et IgE. Par contre dans le cas de la voie Th17, les plasmocytes sécrètent des IgG1, IgG2b et surtout IgG3 (Tableau2).

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgE	Th
IL-4	X				X	Th2
IL-5	X					Th2
IL-23	X		X	X		Th17
IFN-γ		X		X		Th1
TGF-β			X			Treg

	IgG1	IgG3	IgA	Th
IL-4	X	X		Th2
IL-10	X	X		Th2
TGF-β			X	Treg

Tableau 2 : cytokines favorisant l'expression des sous classes d'Ig chez la souris (à gauche) et chez l'humain (à droite)

4.3.b.iii. La mémoire immunologique en réponse aux Ag T-dépendants

Les processus de maturation d'affinité et de sélection des cellules B qui s'opèrent dans les CG visent à générer une mémoire immunologique spécifique à l'Ag envahissant. Le processus de sélection des cellules B dans cet environnement n'est toutefois que partiellement décrit aujourd'hui (Moser et al., 2006), similairement aux signaux qui régulent la différenciation des cellules répondantes vers le stade de cellules mémoires et de plasmocytes. À la sortie des CG, la décision d'aller dans l'une ou l'autre des voies semble dépendre de la stimulation antigénique initiale ainsi que des signaux échangés dans le CG lors de l'interaction T – B (McHeyzer-Williams, 2003).

La mémoire immunologique aux Ag T-dépendants se divise en deux volets : celui des lymphocytes B mémoires et celui des plasmocytes à longue vie, tous deux destinés à produire des Ac spécifiques de haute affinité. Les cellules mémoires constituent un réservoir de cellules spécifiques qui seront à l'origine d'une réponse Ac secondaire. Ainsi, si l'Ag se présente à nouveau, ces cellules seront réactivées spécifiquement et monteront une réponse rapide et amplifiée comparativement à la réponse primaire. Les plasmocytes à longue vie, quant à eux, résident majoritairement dans la moelle osseuse et peuvent produire de grandes quantités d'Ig en absence d'Ag et de lymphocytes B mémoires. À cause de leur persistance et de leur productivité, ces cellules contribuent à la mémoire immunologique par le maintien des titres d'Ac spécifiques dans le sérum (Bernasconi et al., 2002) (Manz et al., 2005 ; Shapiro-Shelef et Calame., 2005). Récemment, il a également été mis en évidence qu'en absence de l'Ag, les cellules mémoires peuvent aussi être activées de façon polyclonale et servir de réservoir de cellules aptes à se différencier constamment en plasmocytes, pour faciliter le

maintien des titres sériques (Bernasconi et al., 2002). Cette contribution des cellules mémoires pourrait clarifier la dynamique du maintien de la mémoire immunologique sérique, puisque la moelle osseuse ne peut héberger qu'un nombre restreint de plasmocytes et que, même s'ils sont dits à longue vie, ces plasmocytes ont tout de même une durée de vie limitée (Lanzavecchia et al., 2006). Une telle production constante d'Ig est clairement importante pour le maintien de l'immunité, particulièrement à cause de la courte demi-vie des Ig dans le sérum. Reflétant la maturation d'affinité et la sélection qui sont survenues durant la génération de cette mémoire immunologique, le répertoire d'Ac « mémoires » en circulation chez l'humain est plus restreint (10^2 -10^3 spécificités) que le répertoire primaire (plus de 10^6spécificités) (Höfer et al., 2006).

La génération des lymphocytes B mémoires :

Les cellules B mémoires se définissent comme étant des cellules spécifiques à l'Ag et à longue durée de vie, dont la survie dépend (Kraus et al., 2004) ou pas (McHeyzer-Williams, 2005) d'une signalisation via le BCR. Elles persistent ainsi dans l'organisme en absence de l'Ag et constituent la population cellulaire qui répondra rapidement par une différenciation massive en plasmocytes si l'Ag ayant déclenché leur génération revient (Traggiai et al., 2003). Bien que les signaux nécessaires pour quitter la réaction du CG et entrer dans le compartiment de cellules mémoires soient peu décrits, cette décision repose vraisemblablement sur l'expression différentielle de différents facteurs de transcription (Calame, 2006; McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005b). La génération des cellules mémoires dépend toutefois de l'interaction préalable CD40-CD154 (Bernard et al., 2005; Bishop and Hostager, 2003).

Suite à des expérimentations réalisées chez la souris par Blink et collaborateurs (Blink et al., 2005), un modèle a été proposé par Dörner et Radbruch, concernant la génération des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes durant la réponse T-dépendante (Dörner and Radbruch, 2005). Ce dernier a été repris dans la Figure 10. L'étude à la base de ce modèle a démontré que des cellules mémoires spécifiques à l'Ag apparaissent dans la circulation une semaine après l'initiation de la réponse primaire (Blink et al., 2005), ce qui est aussi rapide que ce qu'on observe lors de la réponse secondaire chez l'humain. Au fil du temps, ce réservoir de cellules renfermerait des membres exprimant des Ig de plus en plus haute affinité (Blink et al., 2005). Ces cellules ne semblent cependant pas posséder une longue durée de vie et pourraient migrer dans la zone folliculaire du ganglion en suivant l'attraction de certaines chimiokines (Blink et al., 2005). Ces observations suggèrent que ces cellules précoces

représenteraient des cellules mémoires à courte vie qui pourraient, après un passage subséquent dans le CG, devenir des cellules mémoires à longue vie ou des plasmocytes (Dörner et Radbruch., 2005). Les auteurs de ces travaux proposent que ces cellules mémoires à courte vie pourraient être générées durant la réaction des CG, bien qu'aucune évidence directe ne soit présentée. Le fait d'immuniser une souris avec un Ag T-dépendant et de suivre l'apparition des cellules spécifiques dans le sang n'implique pas en soi que toutes les cellules émergeront nécessairement des CG classiques de la zone folliculaire.

En fait, une autre étude réalisée chez la souris met en évidence que les foyers de prolifération qui apparaissent à la frontière des zones T-B rapidement après l'initiation de la réponse, pourraient être associés à des CG puisque leur structure et des cellules qui les composent sont comparables aux CG conventionnels de la zone folliculaire (Inamine et al., 2005). Ces foyers peuvent également générer une première vague de cellules mémoires spécifiques de faible affinité (Inamine et al., 2005), qu'on pourrait associer aux cellules mémoires à courte vie présentées dans le modèle précédent. Les auteurs suggèrent que ces cellules pourraient transiter ou élaborer plus tard un CG classique, afin de constituer une seconde vague de cellules mémoires de haute affinité (Inamine et al., 2005).

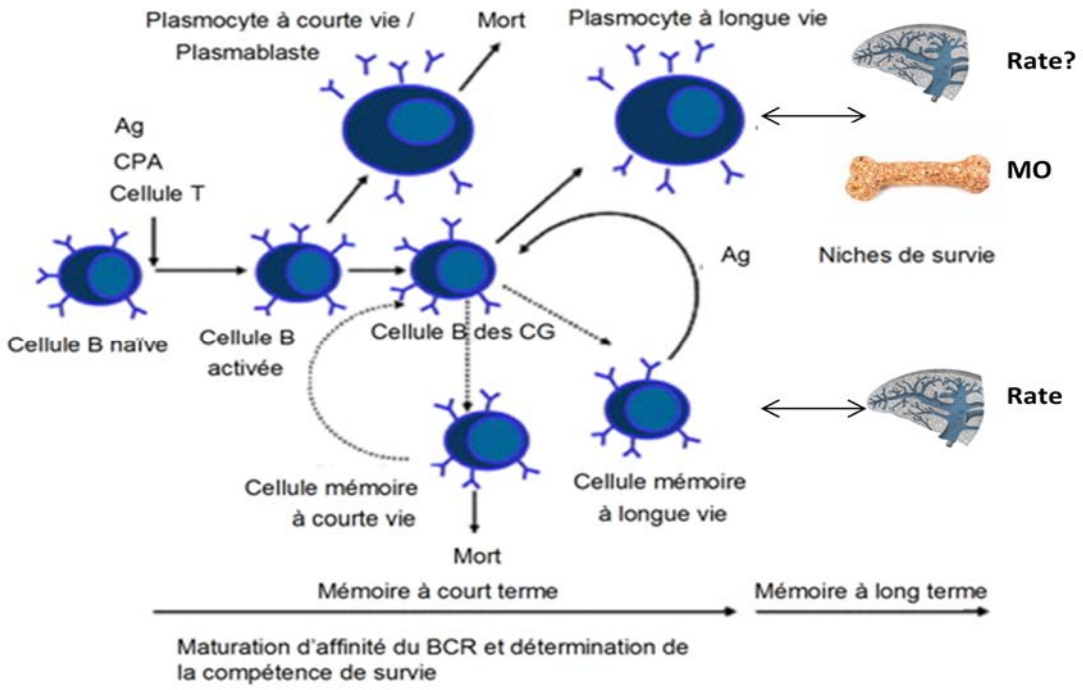


Figure 10 : Nouveau modèle suggéré de la mémoire immunologique. On y propose la génération de cellules mémoires à courte et longue vie ainsi que leur potentiel à repasser par les CG lors d'une réponse primaire à un Ag T-dépendant. CPA : cellules présentatrices d'Ag (Modifiée d'après Dörner et Radbruch., 2005).

Globalement, les travaux de ces deux groupes se complètent, en mettant en lumière qu'une génération rapide de cellules mémoires a lieu *in vivo* durant les réponses T-dépendantes, mais que ces cellules pourraient émerger autant des CG classiques de la zone folliculaire que de structures apparentées à l'extérieur de cette zone. Il n'a toutefois pas été établi par aucune des études précédentes si les cellules à l'origine de cette réponse mémoire précoce sont uniquement des cellules B folliculaires conventionnelles ou bien si elles peuvent faire partie de la catégorie des MZ. Connaissant la capacité des cellules B des MZ à répondre rapidement aux Ag T-dépendants (Lanzavecchia and Sallusto, 2002) (Song et Cerny., 2003) et T-indépendants (Obukhanych et Nussenzweig., 2006), autant par une différenciation en plasmocytes qu'en cellules mémoires, on ne peut exclure leur participation à une telle réponse.

Un autre modèle, proposé par Lanzavecchia et collaborateurs (Lanzavecchia and Sallusto, 2002), amène quant à lui le concept de cellules B mémoires centrales possédant des propriétés de type cellules souches. Selon ce modèle, toutes les cellules mémoires générées lors d'une réponse représenteraient des intermédiaires de différenciation, conservant le pouvoir de proliférer et de se différencier continuellement en plasmocytes, à la suite d'une stimulation polyclonale en absence d'Ag (Tangye and Hodgkin, 2004) (Bernasconi et al., 2002 ; Lanzavecchia et Sallusto., 2002). Ce modèle est d'ailleurs appuyé par la nécessité des cellules à proliférer pour s'engager et avancer dans leur voie de différenciation (Tangye and Hodgkin, 2004). En fait, la régulation de la différenciation des cellules B serait associée aux nombres de divisions cellulaires et viserait à réguler les proportions de cellules mémoires se différenciant en plasmocytes versus celles demeurant mémoires, afin d'éviter un épuisement du réservoir et de balancer les réponses immunitaires (Tangye et Hodgkin., 2004).

Une fois générées, les cellules mémoires persistent dans l'organisme en absence de l'Ag ayant conduit à leur génération. Jusqu'à tout récemment, peu de données étaient disponibles concernant la durée de vie et le maintien des cellules mémoires humaines *in vivo*. La majorité des études à ce sujet provenait du modèle murin, dont l'extrapolation à l'humain n'est pas toujours appropriée, entre autres, à cause des différences au niveau de la durée de vie des deux modèles, de la fraction de cellules hypermutées présentes en circulation, 5% chez la souris et 40% chez l'humain, ainsi que des différentes sources de cellules analysées (Macallan et al., 2005). Les études du modèle murin sont souvent restreintes à la rate alors que chez l'humain, elles se confinent aux ganglions, à la rate et au sang, chacun renfermant des cellules qui diffèrent au niveau de leur état d'activation. Chez la souris, les cellules mémoires

survivent quelques dizaines de mois en se divisant peu ou pas, alors que chez l'humain, il a récemment été démontré qu'en périphérie, les cellules mémoires se divisent, à un taux de prolifération qui est 5 fois plus rapide que celui des cellules naïves (Macallan et al., 2005). Ces observations indiquent que les cellules mémoires seraient maintenues par la prolifération constante de clones (Macallan et al., 2005), ce qui corrobore le modèle de Lanzavecchia et collaborateurs, énonçant l'activation polyclonale continue des cellules mémoires pour maintenir le compartiment (Bernasconi et al., 2002).

Afin de distinguer les cellules B mémoires des cellules naïves, plusieurs critères ont été utilisés au cours des années. Le critère le plus important pour assurer cette distinction repose sur l'analyse moléculaire des gènes des Ig : les cellules porteuses de gènes en configuration germinale sont associées au compartiment naïf, alors que la présence de mutations somatiques dans ces gènes identifie les cellules mémoires (Klein et al., 1998). Des caractéristiques plus facilement identifiables, impliquant l'expression de marqueurs de surface, ont par la suite été déterminées. Entre autres, l'expression différentielle de l'IgD a longtemps été utilisée : les cellules IgD^+ étant associées aux cellules naïves et les cellules IgD^- aux cellules mémoires (Black et al., 1978; Hayakawa et al., 1987). Cependant, l'interprétation de ce marqueur a été mise en cause avec la découverte d'une sous-population de cellules B mémoires exprimant des IgD en surface (Klein et al., 1998). Actuellement, le marqueur CD27 est largement utilisé pour l'identification des cellules B mémoires humaines, puisque son expression en surface corrèle avec la présence de mutations somatiques dans les gènes des Ig (Agematsu et al., 2000; Klein et al., 1998; Tangye et al., 1998).

La génération des plasmocytes à longue durée de vie :

Au même titre que les cellules mémoires proprement dites, les plasmocytes à longue vie font partie du compartiment mémoire à cause de leur contribution à la mémoire humorale sérique. Un facteur de différenciation clé, nommé BLIMP-1 chez la souris et *positive regulatory domain I-binding factor 1* (PRDI-BF1) chez l'humain (Medina et al., 2002) est nécessaire au développement des plasmocytes, à leur sécrétion d'Ac (Kallies et al., 2004)(Shapiro-Schelef et Calame., 2005) ainsi qu'à leur survie dans la moelle osseuse (Calame, 2006). L'expression de ce facteur est augmentée plus la cellule avance en différenciation (Kallies et al., 2004) et elle semble nécessaire à la sortie de la cellule du CG (Calame, 2006). Ce facteur est en fait un répresseur transcriptionnel qui empêche l'expression des facteurs de transcription BCL-6 et PAX-5 requis dans les CG, s'assurant ainsi que les cellules engagées dans la voie des plasmocytes ne puissent retourner en arrière (Shapiro-Schelef et Calame., 2005). Il est

l'initiateur d'une longue séquence d'événements moléculaires menant ultimement à la différenciation en plasmocytes, revue en détails dans (Shapiro-Schelef et Calame., 2005).

La figure 11 (page suivante) montre les différents facteurs de transcription impliqués dans la réaction du centre germinatif et la différentiation terminale des lymphocytes B.

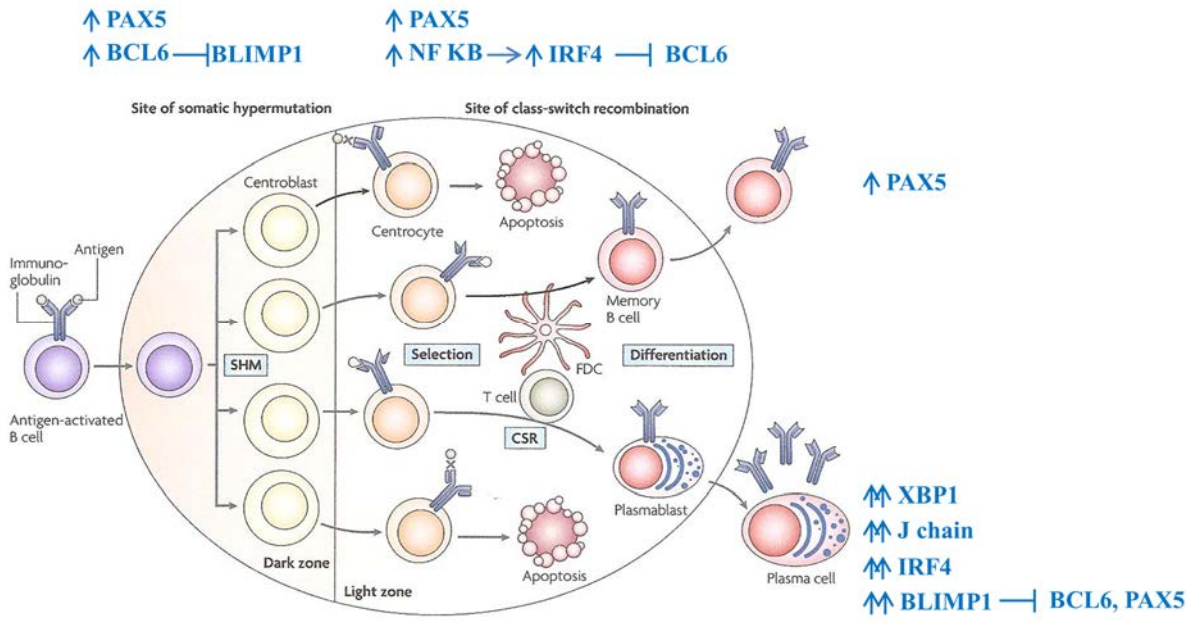


Figure 11 : les facteurs de transcription impliqués dans la réaction du centre germinatif et la différentiation terminale des lymphocytes B (d'après Klein and Dalla-Favera, 2008).

De même, il a été montré dans les cellules B que STAT5 bloque la différentiation plasmocytaire et favorise la prolifération cellulaire (Scheeren et al., 2005). Chez l'homme, STAT5 augmente l'expression de BCL6 qui, à son tour, inhibe la différentiation des cellules B en plasmocytes (Scheeren et al., 2005) (figure 12). Un déficit dans l'expression de STAT3 a également été associé à un défaut de production des plasmocytes à IgG (Fornek et al., 2006). Par ailleurs, il a été démontré que STAT3 augmente l'expression de BLIMP1 et favorise la différentiation des plasmocytes dans les lignées B murines (Reljic et al., 2000) (figure 12). L'équipe de Diehl et al., a montré que l'activation de STAT3 dans les cellules B humaines augmente l'expression de BLIMP1 et conduit à la différentiation des plasmocytes et que cette activation est suffisante pour induire BLIMP1 même en présence de BCL6 (Diehl et al., 2008). Toutes les cytokines capables d'activer la phosphorylation de STAT3 dans divers types de cellules (IL-6, IL-10 et IL-21) sont impliquées dans la différentiation plasmocytaire

(Ettinger et al., 2005; Jego et al., 2001; Riley et al., 1999). En effet, l'IL-6 semble jouer un rôle dans la survie des plasmocytes (Kawano et al., 1995). Elle est particulièrement importante pour la survie des plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle osseuse (Kawano et al., 1995). De même, il a été démontré que la production d'IL-6 est dépendante de XBP1 (Iwakoshi et al., 2003; Wen et al., 1999). L'implication de STAT3 et STAT5 dans la voie de différentiation plasmocytaire est résumée dans la figure 12.

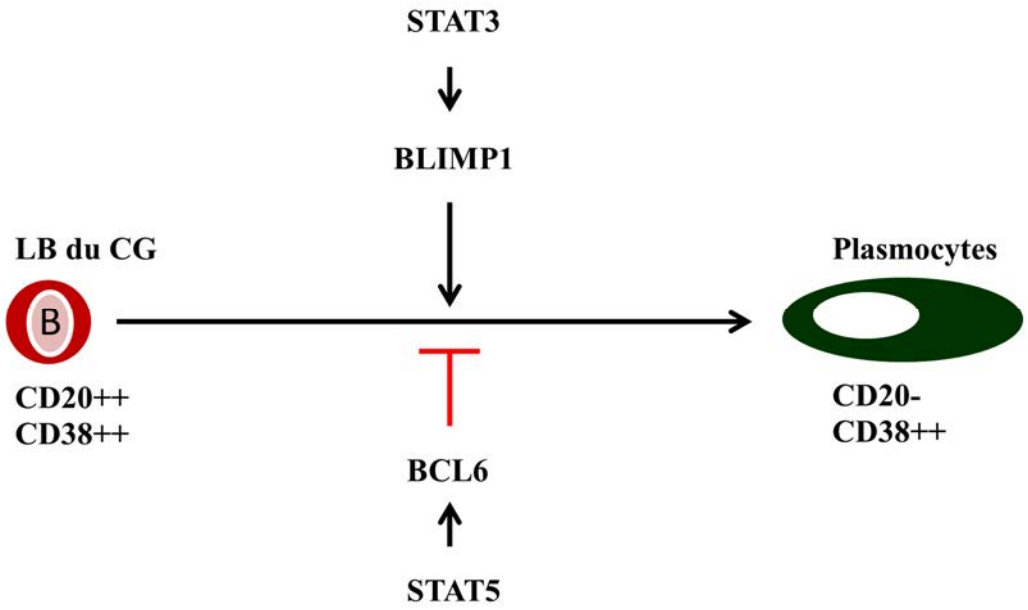


Figure 12: l'activation de STAT 3 augmente BLIMP1 qui à son tour favorise la différentiation des plasmocytes. En revanche, l'activation de STAT5 augmente BCL6 qui, à son tour, inhibe la voie de différentiation plasmocytaire (d'après Diehl et al., 2008 ; Scheeren et al., 2005).

Les plasmocytes à longue vie expriment habituellement des Ig d'autres isotypes que l'IgM qui sont de haute affinité, ayant pris part au processus d'hypermutation somatique (Calame, 2006). Ils ont une capacité unique à produire de façon persistante des titres élevés de ces Ac mémoires (Moser et al., 2006) atteignant quelques milliers de molécules d'Ac par seconde (Hibi and Dosch, 1986; Manz et al., 2005). On estime le taux de sécrétion pour toute la population de la moelle osseuse à 250µg/ml d'Ig par jour (Traggiai et al., 2003). Dans cet environnement, ces cellules ne possèdant pas la capacité de se renouveler seules (McHeyzer-Williams, 2005), ont cessé toute synthèse d'ADN et sont réfractaires à des signaux supplémentaires de l'Ag (Hofer et al., 2006). Le stade de plasmocyte se traduit également par un changement au niveau de la morphologie cellulaire : les plasmocytes sont 2 à 3 fois plus volumineux que les cellules naïves ou mémoires, renferment un abondant cytoplasme et un noyau à position excentrique, contrastant avec les noyaux centrés des autres populations

(Ellyard et al., 2004; Medina et al., 2002). Également, on note chez ces cellules la présence d'Ig intracellulaires couplée à leur disparition de la surface (O'Connor et al., 2003) ou bien à une diminution de leur expression (Ellyard et al., 2004; Horst et al., 2002). Elles expriment aussi à un haut niveau les molécules CD38 (Jego et al., 1999; Medina et al., 2002), CD27 (Avery et al., 2005; Horst et al., 2002; Jung et al., 2000; Medina et al., 2002) et CD138, cette dernière étant aussi appelée syndecan-1 (Medina et al., 2002 ; Horst et al., 2002 ; Jego et al., 1999).

Bien que toutes les cellules B expriment CXCR4 (Manz et al., 2005), le CXCL12/SDF1 qui est produit par les cellules stromales de la MO n'attire que les plasmablastes issues du CG mais pas les plasmocytes matures (Moser et al., 2006). Ces derniers ont besoin d'autres facteurs actuellement inconnus (Hofer et al., 2006)

Bien que la différenciation des cellules B en plasmocytes à longue vie soit peu décrite, il est établi que la stimulation préalable du CD40 est nécessaire mais non suffisante à leur génération (Moser et al., 2006). Des signaux supplémentaires provenant de la niche de la moelle osseuse permettraient vraisemblablement d'achever la différenciation des plasmablastes en plasmocytes et de maintenir leur survie (Moser et al., 2006). En effet, la capacité à survivre des plasmocytes à longue vie ne semble pas être une propriété intrinsèque des cellules, mais semble plutôt dépendre de l'aptitude de ces dernières à répondre aux signaux des cellules stromales de la moelle osseuse (Manz et al., 2005). On soupçonne la contribution de CD21 et de BCMA, récepteur de BAFF (*B-cell-activating factor belonging to the TNF family*) et APRIL, à la génération des plasmocytes et/ou à leur survie (Moser et al., 2006).

La moelle osseuse contient un nombre limité de niches favorisant la différenciation et la survie des plasmocytes, puisqu'au cours de la vie d'un individu, la fréquence de plasmocytes dans cet environnement est constante (Manz et al., 2005). Elle excède rarement 1% des cellules, aussi bien chez la souris que chez l'humain (Hofer et al., 2006). Cette stabilité implique que les nouveaux plasmocytes formés à chaque réponse immunitaire entreront en compétition avec de plus anciennes cellules pour gagner leur survie dans ce contexte (Manz et al., 2005). Ce concept de compétition prend son importance à chaque nouvelle infection, lorsque les cellules mémoires sont réactivées lors d'une réponse secondaire. Chez la souris, il a été démontré que les plasmocytes dans la moelle osseuse pourraient vivre aussi longtemps que l'animal (Slifka et al., 1998), en absence de cellules mémoires. Chez l'humain, cette

question fait toujours l'objet de débats (Manz et al., 2005). On postule que leur demi-vie serait beaucoup plus courte, soit d'environ trois mois (Manz and Radbruch, 2002; Traggiai et al., 2003). Cependant, sachant que ces cellules sont dépendantes des signaux de la moelle osseuse pour survivre, il n'est pas exclu que leur demi-vie puisse être aussi longue que celle des cellules de souris, lorsque leur localisation n'est pas modifiée.

4.3.c. La réponse extrafolliculaire des lymphocytes B naïfs

Rapidement après l'initiation de la réponse T-dépendante, on assiste à l'élaboration de la réponse extrafolliculaire, dont la finalité est de produire des plasmocytes à courte durée de vie permettant de maîtriser temporairement l'infection en cours. Les signaux nécessaires à l'amorçage de cette réponse extrafolliculaire demeurent peu décrits (MacLennan et al., 2003; McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005a). Ils initient la prolifération des lymphocytes B dans la zone riche en cellules T des organes lymphoïdes secondaires (MacLennan et al., 2003). Des molécules comme l'IFNα augmentent la prolifération des plasmocytes à vie courte chez les souris normales (BALB/c) et lupiques (Koutouzov et al., 2006; Mathian et al., 2011). Cependant, dans cette zone T, les cellules B peuvent procéder rapidement à la commutation isotypique et engager leur différenciation en plasmablastes (MacLennan et al., 2003) environ une journée après l'initiation du contact avec la cellule T (Sze et al., 2000). Une étude réalisée chez la souris a démontré que leur prolifération et leur commutation isotypique seraient dépendantes de l'interaction précoce T-B via la stimulation du CD40 par le CD154 (Cunningham et al., 2004). Par la suite, les plasmablastes générés migrent dans la zone extrafolliculaire où ils continuent à proliférer sans l'aide des cellules T et où ils achèvent leur différenciation en plasmocytes (MacLennan et al., 2003). Les cellules accessoires impliquées dans la différenciation terminale des plasmablastes et dans la survie des plasmocytes générés sont les DC CD11c^{high} et se localisent aussi dans la zone extrafolliculaire (MacLennan et al., 2003).

LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC)- B

1 Définition et historique

La leucémie lymphoïde chronique est une affection hématologique caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B phénotypiquement matures mais néanmoins immunologiquement incompétents dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes (Caligaris-Cappio, 1996; Messmer et al., 2005). C'est la forme de leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux. Elle représente 0,8% de tous les cancers et quasiment 30% de toutes les formes de leucémies de l'adulte. Le risque de développer une leucémie lymphoïde chronique augmente avec l'âge (en moyenne vers 60 ans) et touche 2,8 fois plus les hommes que les femmes (Diehl et al., 1999; Redaelli et al., 2004).

En 1967 c'est Dameshek qui émit l'hypothèse que la LLC était caractérisée par l'accumulation de lymphocytes incompétents (Dameshek, 1967). Au début des années 70, on trouva que la majorité des cellules de LLC expriment des immunoglobulines de surface, indiquant leur appartenance à la lignée B (Fialkow et al., 1978; Fu et al., 1974; Preud'homme and Seligmann, 1972; Salsano et al., 1974; Schroer et al., 1974). Le caractère clonal fut ensuite confirmé par des expériences de génétique moléculaire.

A la fin des années 70, deux classifications cliniques furent proposées par Rai et Binet en fonction des complications cliniques engendrées par la pathologie (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975).

En 1999, il a été démontré que les patients dont les cellules leucémiques ne présentant pas de mutation dans la région variable de leurs immunoglobulines (environ 40% des cas) développaient une maladie avec un plus mauvais pronostic que ceux avec des immunoglobulines mutées (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999). Néanmoins, par des analyses de transcriptome, un profil d'expression génique caractéristique de la leucémie lymphoïde chronique indépendamment du statut mutationnel de l'immunoglobuline a pu être déterminé (Klein et al., 2001; Rosenwald et al., 2001). Ce profil suggère que la leucémie lymphoïde chronique est constituée de cellules de type mémoire plutôt que de cellules B $CD5^+$. Ces cellules $CD5^+$ (B1a-like) composent plus de 80% des cellules B du cordon ombilical et leur pourcentage diminue progressivement après la naissance jusqu'à la puberté où leur taux atteint 10% à l'âge de 14 ans.

2 Etiologie et Pathogénèse

2.1. Facteurs environnementaux et héréditaires

Aucun facteur environnemental n'a été retrouvé comme facteur prédictif de la leucémie lymphoïde chronique. Certaines études ont accusés le virus de l'hépatite C (HCV) (Bianco et al., 2004) mais ce virus n'est pas nécessaire au développement de la pathologie (Luppi et al., 1996). En revanche, de manière intéressante, les cellules de LLC sont résistantes à l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) in vitro (Avila-Cariño et al., 1997). Les raisons de cette caractéristique ne sont pas encore connues. Mais l'on ne peut exclure une infection de ces cellules avec l'EBV ou avec un virus apparenté, antérieure au développement de la pathologie. Néanmoins, on n'a jamais retrouvé de séquences correspondant à ces virus dans les cellules de LLC.

La majorité des patients ont plus de 60 ans (90% ont plus de 50 ans) et l'âge moyen de diagnostique se situe entre 64 et 70 ans. Bien que l'incidence de la leucémie lymphoïde chronique soit plus élevée chez l'homme que chez la femme, aucun lien n'a encore été trouvé concernant le rôle joué par les hormones (Adami et al., 1997; Cartwright et al., 2002). En revanche, il existe bien une contribution génétique puisque la LLC est une pathologie très rare chez les populations asiatiques et ce même lorsque celles-ci ont migré dans un pays occidental (Ahn et al., 1991; Tamura et al., 2001). De même, les parents de personnes ayant eu une LLC ont trois fois plus de chance d'être atteints à leur tour de LLC ou d'une affection lymphoïde que la population générale (Cuttner, 1992; Goldin et al., 2004). Ceux-ci développent d'ailleurs l'affection en étant plus jeunes (Rawstron et al., 2004; Yuille et al., 2000). Ces facteurs génétiques ne sont pas encore connus. Mais il ne semble pas y avoir d'association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Jones and Whittaker, 1991; Shah et al., 1992). Plus récemment, l'inhibition épigénétique de la DAPK1 (Death Associeted Protein Kinase 1) à été évoqué comme un facteur de prédisposition héréditaire (Raval et al., 2007).

2.2. Cytogenèse

Les cellules de LLC expriment à leur surface des antigènes de cellules B, tels que CD19 et CD20 (Marti et al., 1992). Mais également un marqueur de cellule B mémoire, CD27, un membre de la famille des récepteurs au TNF (Ranheim et al., 1995). C'est également la seule

pathologie B, avec le lymphome du manteau, à être $CD5^+$ (Bell et al., 1999; Cabezudo et al., 1999) et qui, tout comme les lymphocytes B-1a, présentent un phénotype anergique. Mais surtout, ces cellules semblent présenter un profil d'expression caractéristique, différent de celui d'autres pathologies B, de cellules B normales ou même de lymphocytes B issus de sang de nouveau-nés qui sont majoritairement CD5 positifs. Leur profil d'expression semble d'ailleurs plutôt correspondre à celui de cellules non-naïves, qui ont déjà subi une activation antigénique et que l'on trouve généralement dans la zone marginale de la rate (voir le tableau ci dessous)

	B -MZ	**B-CD5 naturelles**	**B mémoires**	**B-LLC**
CD5	+/- à ++	+	+/-	+
CD19	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+/-
CD22	+	+	+/-	-
CD23	-	+	+	+
CD27	-	-	+	+
CD43	-	++/-	-	+
IgM	+++	+++	+/-	Low
FMC7	+	+	+	+/-

Tableau 3 : les différents marqueurs de surface des cellules B de LLC vs B-MZ (Marginal zone), B-CD5 naturelles et cellules B mémoires (D'après Marti et al., 1992 ; Ranheim et al., 1995 ; Bell et al., 1999 ; Cabezudo et al., 1999 ; Banchereau and Rousset, 1992; Deans and Polyak, 2008; Dighiero and Hamblin, 2008).

2.3. Anomalies cytogénétiques

Les cellules leucémiques d'approximativement la moitié des patients possèdent des anomalies chromosomiques. La plus commune est la délétion 13q14-23, suivie dans l'ordre par la trisomie 12 (Chena et al., 2003), les délétions 11q22.3-q23.1, 6q21-q23 (Döhner et al., 1999), 17p13.1 (impliquant la délétion ou la mutation du gène suppresseur de tumeurs TP53) (Barnabas et al., 2001) et les anomalies 14q. Il s'agit essentiellement de délétions ou mutations mais rarement de translocations chromosomiques (Sen et al., 2002). L'identification de gènes présents dans ces différentes régions chromosomiques est un outil précieux pour mieux comprendre le mécanisme de la tumorogénèse.

2.4. Modèle animal pour la LLC

Il n'existe pas à ce jour de modèle animal de LLC. Cependant, Bichi et al ont démontré, pour la première fois, que des souris transgéniques pour la TCL1 (human T cell Leukemia-1 gene) sous contrôle d'un promoteur µ développent une expansion clonale B similaire à celle observée chez des sujets atteints de lymphocytose monoclonale essentielle B (Bichi et al., 2002). Cette expansion de cellules clonales B $CD5^+$ est détectable dans le péritoine à l'âge de 2 mois, puis dans la rate entre 3 et 5 mois et enfin dans la moelle osseuse entre 5 et 8 mois. Des souris plus âgées développent une maladie similaire à la LLC avec des caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et cliniques semblables à celles observées chez l'homme (Bichi et al., 2002 ; Yuille et al., 2001). A noter que le gène TCL1 n'est pas impliqué dans la LLC.

D'autres souches de souris ont été rapportées pour développer une LLC. Chez les souris NZB (New Zealand Black), qui développent des lymphoproliférations CD5 positifs à un âge avancé, trois loci au total ont été associés à ce phénotype y compris une mutation ponctuelle à proximité de la tige-boucle de miR-16-1(Raveche et al., 2007). Alors que dans ces études, le rôle de miR-15a/16-1 dans la pathogenèse de la leucémie lymphoïde chronique de type lymphoprolifératif observée n'a pas pu être démontrée de façon concluante en raison de la complexité du génotype, l'observation que la délétion du gène de ce groupe de microARN favorise le développement d'une LLC, soutient cette hypothèse.

Plus récemment, Klein et Dalla-Favera ont confirmé *in vivo* que la délétion de la région MRD (Minimal Deleted Region) du chromosome 13q14 est impliquée dans la pathogénie de la LLC (Klein and Dalla-Favera, 2010). Les souris transgéniques utilisées ont été conçues pour imiter la délétion humaine 13q14-MRD et développer une LLC ainsi que d'autres lymphoproliférations associées à cette délétion 13q14. Deux lignées transgéniques ont été générées. Un modèle représente le MDR, un second contient une délétion spécifique de miR-15a/16-1 dans l'intron 4 du gène DLeu2 (figure 18, page suivante). Les deux lignées de souris ont développé tardivement des lymphoproliférations clonales qui ont été pour la plupart indolentes et produites dans un modèle autonome de cellule B.

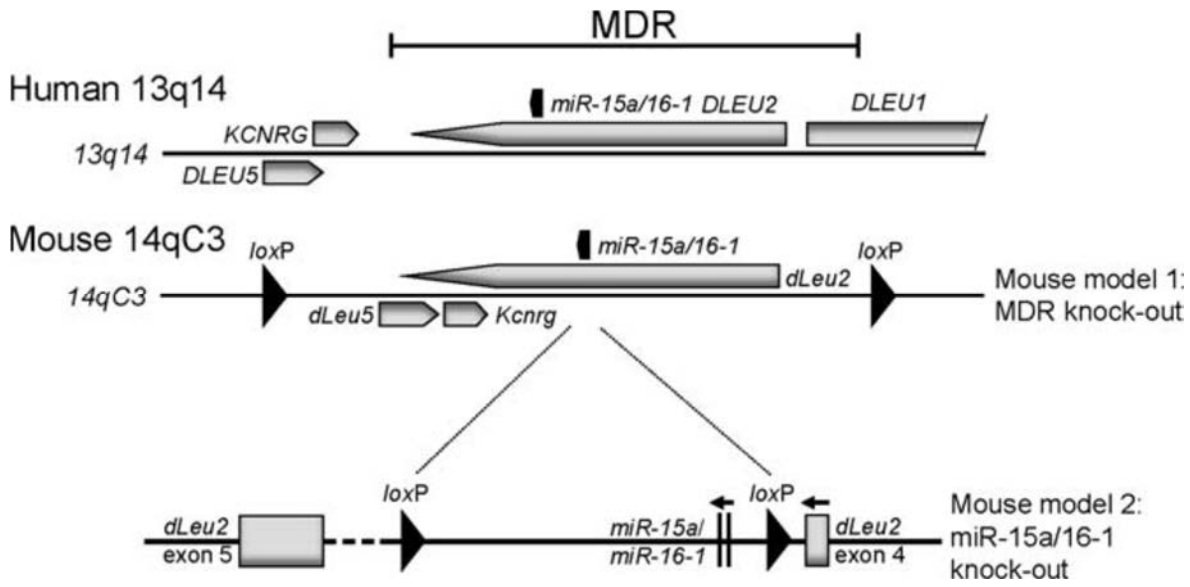


Figure 18 : modèles murins de la délétion 13q14. Chez la souris, le locus 13q14 humain se trouve sur la région chromosomique 14qC3. Modèle 1 imite une LLC humaine avec délétion du MDR de al région 13q14; modèle 2 délaite le cluster miR-15a/16-1 sans interférer avec l'expression du dLeu2 (Klein and Dalla-Favera, 2010).

2.5. Accumulation de cellules leucémiques

<u>*Cinétique de croissance*</u>

Dans la rate, les cellules leucémiques prolifèrent préférentiellement dans la pulpe blanche (Lampert et al., 1999). En revanche, les cellules circulant dans le sang sont majoritairement en phase G0 du cycle cellulaire (Andreeff et al., 1980). Il est clairement admis que les cellules de LLC s'accumulent surtout par défaut d'apoptose. En réalité, des expériences réalisées chez des patients ayant ingéré de l'eau lourde (avec du deutérium, D_2O) ont démontré que le taux de « naissance » *in vivo* des cellules leucémiques va de 0,1% à 1% du clone par jour (Messmer et al., 2005). Ce taux élevé à été constaté même chez des patients où la quantité de lymphocytes dans le sang reste stable. Les formes les plus agressives présentent un taux de prolifération plus élevée. Ces résultats sont en contradiction avec l'idée selon laquelle la LLC est une maladie statique. En réalité ceci suggère que le taux de lymphocytes leucémiques dans le sang dépend d'un processus dynamique où le taux d'apparition de nouvelles cellules est compensé par celui de mort cellulaire. Mais globalement, le taux d'apoptose est inférieur à celui de prolifération ce qui aboutit à une accumulation de ces cellules.

Résistance à l'apoptose

Les cellules de leucémie lymphoïde chronique expriment de forts taux de la protéine anti-apoptotique, BCL-2 (Schimmer et al., 2003). Mais d'autres protéines anti-apoptotiquess sont également fortement exprimées, telles que Bcl-x_L, Mcl-1 et Bag-1 (Kitada et al., 1998). De taux faibles d'expressions de protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bcl-x_S sont observés (Gottardi et al., 1996).

Le microenvironnement tumoral semble également jouer un rôle important dans la sensibilité des cellules leucémiques à l'apoptose. En effet, ces cellules peuvent survivre de longues périodes *in vitro* si elles sont cultivées en présence de cellules stromales non hématopoïétiques de la moelle osseuse (Lagneaux et al., 1998; Panayiotidis et al., 1996) ou de cellules nourricières (Burger et al., 2000) qui sont des cellules auxiliaires non leucémiques se différenciant à partir de cellules mononuclées CD14+ du sang lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules de leucémie lymphoïde chronique (Tsukada et al., 2002). Des cellules présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques et morphologiques que ces cellules nourricières sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (Tsukada et al., 2002) où elles participent probablement à l'inhibition de l'apoptose des cellules leucémiques *in vivo*. Les FDC peuvent également protéger les cellules de la leucémie lymphoïde chronique de la mort cellulaire (Pedersen et al., 2002). Ces différents mécanismes de protection semblent requérir un contact cellulaire et doivent probablement impliquer plusieurs interactions récepteur-ligand ainsi que des molécules d'adhésion.

Déficits immunitaires

Les patients avec une leucémie lymphoïde chronique développent des déficits immunitaires à prédominance humorale avec la présence des auto-anticorps causant une Anémie Hémolytique auto immune (AHA) et une Thrombopénie (Winkelstein and Jordan, 1992). Avec le temps, les taux d'immunoglobulines sériques diminuent progressivement, conduisant à une hypogammaglobulinémie IgM puis IgG qui est en rapport avec l'inhibition de la différentiation plasmocytaire. De plus, ces patients peuvent présenter de faibles taux de complément (Schlesinger et al., 1996), des défauts fonctionnels des lymphocytes T (inhibition de la réponse T contre les virus de type Herpes) (Rossi et al., 1996), des niveaux d'expression antigène-CMH altérés dans les cellules leucémiques (Nückel et al., 2005; Veenstra et al., 1996) et une activité granulocytaire défectueuse (Itälä et al., 1996). Les cellules leucémiques elles-mêmes peuvent contribuer à cet état d'immunodéficience en produisant des cytokines

immunosuppressives telles que le TGF-β (Lagneaux et al., 1997) et l'IL-10 (Sjöberg et al., 1996). Dans 90% des cas, les cellules leucémiques expriment l'immunoglobuline de surface à un faible niveau. Les immunoglobulines exprimées par les cellules de la leucémie lymphoïde chronique présentent souvent une réactivité vis-à-vis d'auto-antigènes. Une caractéristique importante de ces auto-anticorps est leur « poly-réactivité », c'est-à-dire leur capacité à reconnaitre plusieurs auto-antigènes

3 Rôle de Mda-7/IL-24 dans la leucémie lymphoïde chronique

Dans les travaux précédents, notre équipe a démontré qu'il existait dans les cellules de la leucémie lymphoïde chronique un profil d'expression génique en partie assimilable à une signature CD5 (Gary-Gouy et al., 2007). Parmi les différentes familles de gènes induits par le CD5, plusieurs gènes de la famille de l'IL-10 et de leurs récepteurs sont retrouvés, dont le gène Mda-7/IL-24. Notre équipe a également montré que Mda-7/IL-24 joue un rôle complexe dans les cellules B de la leucémie lymphoïde chronique pouvant contribuer à la physiopathologie de cette maladie. Dans ces cellules, le gène Mda-7/IL-24 est fortement exprimé. Ceci est corrélé avec le caractère différentié et hors cycle des cellules de LLC (Sainz-Perez et al., 2006). En effet, Mda-7/IL-24 est exprimé surtout dans des cellules différenciées (mélanocytes) est son expression est perdue dans les cellules en prolifération ou bien les cellules indifférenciées.

En ce qui concerne la protéine, son expression est fortement détectée dans les lysats cellulaires de cellules leucémiques. Ces résultats confirment ceux obtenus sur les transcrits. Mda-7/IL-24 sous sa forme native fait environ 23 KDa, mais elle possède plusieurs sites de glycosylation pouvant lui conférer un poids de 34 KDa. Notre équipe a détecté principalement la forme à 23 KD dans les lysats cellulaires. Ceci indique que les cellules de la leucémie lymphoïde chronique produisent essentiellement la forme non glycosylée (Sainz-Perez et al., 2006).

Mda-7/IL-24 est également décrit comme un gène dont le produit d'expression peut être sécrété sous forme d'une cytokine (Caudell et al., 2002). De manière surprenante, Mda-7/IL-24 est absente dans les sérums des patients leucémiques (Sainz-Perez et al., 2006). Ceci peut donc provenir d'un défaut de sécrétion intrinsèque des cellules de la leucémie lymphoïde chronique. Néanmoins, on retrouve dans le sérum de patients leucémiques des quantités significatives de plusieurs cytokines telles que, IL-6, IL-10 ou TGF-β, mais ces cytokines

peuvent être sécrétées par d'autres cellules. Une autre hypothèse est que la protéine sécrétée est immédiatement internalisée par la cellule leucémique via ses récepteurs, constituant ainsi une boucle de régulation autocrine (Sainz-Perez et al., 2006).

Différentes études ont montré que Mda-7/IL-24 est capable d'activer la voie de signalisation p38 MAPK dans différentes lignées cellulaires (Sarkar et al., 2002b). Il s'agit d'une voie de stress au carrefour de plusieurs signaux régulant le cycle cellulaire, l'apoptose et la survie cellulaire. Alors que l'activation de la voie p38 MAPK par Ad.Mda-7 sur différentes lignées conduit à un signal pro-apoptotique, elle joue un rôle de survie dans les cellules hépatiques humaines où elle est constitutivement active (Mendelson et al., 1996).

Notre équipe a montré que Mda-7/IL-24 est capable d'induire la voie de la p38 MAPK dans les cellules de la leucémie lymphoïde chronique. Fait intéressant, cette voie de signalisation est constitutivement active dans les cellules de la leucémie lymphoïde chronique. Les résultats obtenus après inhibition des transcrits Mda-7/IL-24 par siRNA ont permis d'affirmer que la protéine endogène est capable d'activer cette voie. On a également montré que l'action de la protéine endogène peut être mimée par la protéine soluble IL-24. Les cellules de la leucémie lymphoïde chronique sont donc sensibles à Mda-7/IL-24 sous sa forme cytokine (Sainz-Perez et al., 2006). De même, Sainz-Perez *et al.* ont montré que la voie p38 MAPK joue un rôle de survie dans les cellules de la leucémie lymphoïde chronique puisque l'apoptose des ces cellules a été induite après incubation avec l'inhibiteur spécifique de P38 MAPK, le SB 203580. Ils ont également montré, à l'aide de siRNA dirigés contre les transcrits Mda-7/IL-24, que la protéine Mda-7/IL-24 endogène contribue à la survie des cellules de la leucémie lymphoïde chronique. Cet effet a pu être mimé par l'ajout de l'IL-24 qui est capable de « reverser » l'effet pro-apoptotique du SB 203580. Sur des cultures à long terme de cellules leucémiques, ils ont également confirmé le rôle de l'IL-24 en tant que facteur de survie des cellules leucémiques. En revanche, l'IL-24 recombinante induit l'apoptose des cellules de LLC *in vitro* à condition qu'elles aient été mises en cycle au préalable (par l'IL-2) (Sainz-Perez et al., 2008). Ce travail implique que l'IL-24 recombinante tue des cellules activées et/ou en cycle, ce qui corrobore les résultats d'autres équipes sur des lignées cellulaires.

LES CYTOKINES DE CLASSE II

1 Généralités

Les membres de la famille de l'interleukine-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24/Mda-7 et IL-26) font partie, avec les interférons de type I et II ainsi que les interférons like (limitin, IL-28A, IL-28B et IL-29), de la grande famille des cytokines de classe II à hélices α (Kotenko, 2002; Renauld, 2003). Bien que ces molécules possèdent une structure similaire et une origine commune, leurs fonctions biologiques ne sont pas identiques et sont parfois même antagonistes. Schématiquement, il semble que ces cytokines jouent un rôle dans l'immunité innée ainsi que dans le contrôle naturel de l'auto-immunité (Renauld, 2003). Cinq nouveaux membres de la famille de l'IL-10 ont été décrits chez les mammifères dernièrement en utilisant des techniques de clonage de cDNA par hybridation soustractive dans différents modèles cellulaires : la différentiation mélanocytaire (IL-24) (Jiang et al., 1995), la transformation des cellules T induite par des virus (IL-26) (Knappe et al., 2000) ou l'induction génique médiée par l'IL-9 (IL-22) (Dumoutier et al., 2000a). Enfin, par l'analyse bioinformatique du génome : IL-19 (Gallagher et al., 2000) et IL-20 (Blumberg et al., 2001).

Bien que parmi ces membres il existe une faible homologie en structure primaire (homologies de séquences en acides aminés : 18-25%) (Figure 13, page suivante), ils conservent des caractéristiques structurelles et une organisation génomique similaires. En effet, l'IL-10, IL-19, IL-20 et l'IL-24 se situent sur le même cluster 1q32 du chromosome 1 humain et l'IL-22 avec l'Il-26 se situent sur la même région 12q15 que l'IFN-γ sur le chromosome 12 (Figure 14, page suivante). De même, ils possèdent tous une structure tertiaire similaire, composée de 6 hélices α (Chang et al., 2003). Ceci indique qu'ils sont très probablement dérivés à partir d'un ancêtre commun. Par ailleurs, on trouve les équivalents de ces gènes chez la souris, sauf pour IL-26.

En parallèle, une famille de récepteurs aux cytokines de classe II a été décrite, basée sur la structure de leur domaine extracellulaire (Figure 15, page suivante). En revanche cette homologie ne concerne pas les domaines intracytoplasmiques. Ces récepteurs s'associent pour former des hétérodimères de haute affinité. Ces hétérodimères sont classiquement constitués d'une chaine appelée « longue » et d'une chaîne appelée « courte » en fonction de la longueur de la région intra-cytoplasmique. Une chaîne déterminée peut s'associer avec différentes chaînes de manière à constituer une variété d'hétérodimères différents pouvant lier une ou

plusieurs cytokines de la famille de l'IL-10. De même, une cytokine déterminée peut s'associer à différents hétérodimères (Figure 15, page suivante). Ainsi par exemple, la chaîne IL-10Rβ peut lier l'IL-10 lorsqu'elle est associée avec la chaîne IL-10Rα (Kotenko et al., 1997), ou l'IL-22 lorsqu'elle est associée à l'IL-22Rα1 (Dumoutier et al., 2000b; Kotenko et al., 2001; Xie et al., 2000). Il existe également des récepteurs solubles comme l'IL-22BP, probablement impliqué dans la modulation de l'activité de ces différents facteurs (Kotenko et al., 2001), ou encore l'homodimère IL20R2 soluble qui semble être un potentiel bloqueur de l'IL-24 dans un modèle de souris transgénique IL-24 (He and Liang, 2010).

Figure 13 : Arbre phylogénétique des différentes cytokines de la famille de l'IL-10(Modifiée d'après Renauld et al., 2003).

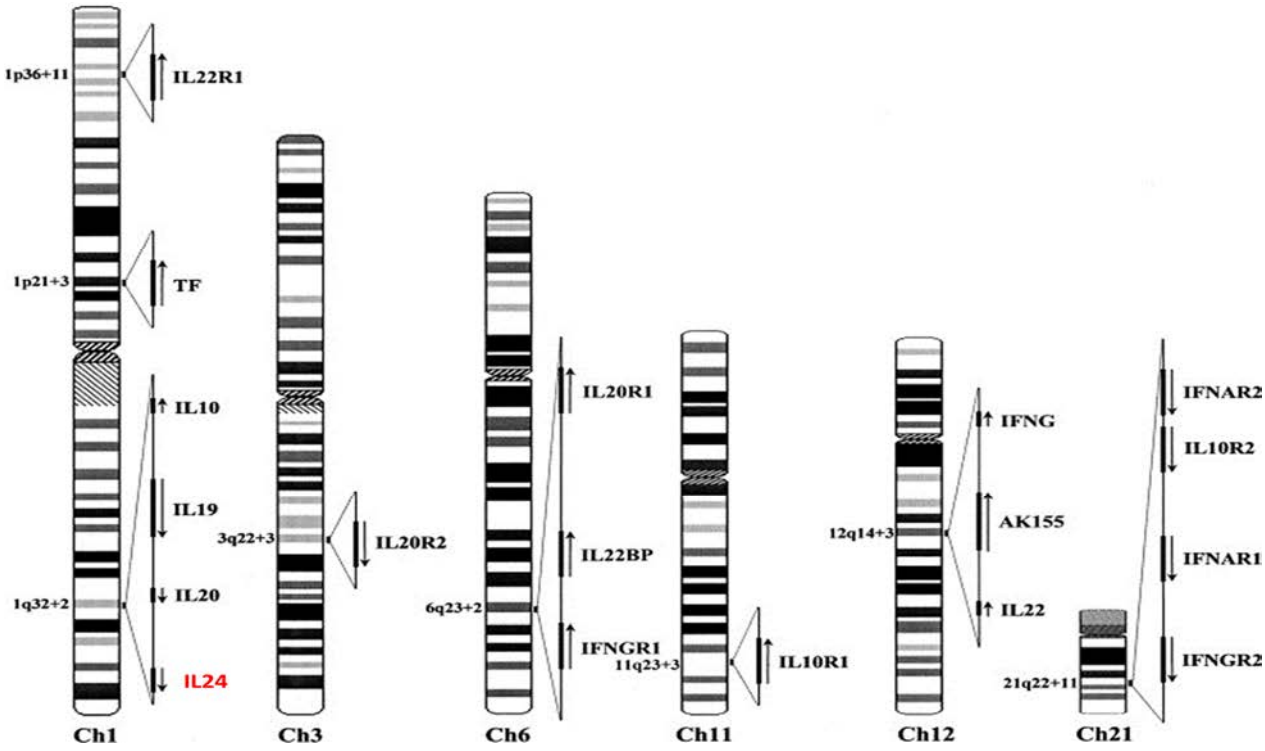


Figure 14 : Localisation chromosomique des gènes codant pour les cytokines de la famille de l'IL'10 ainsi que leurs récepteurs dans le génome humain (D'après Kotenko, 2002)

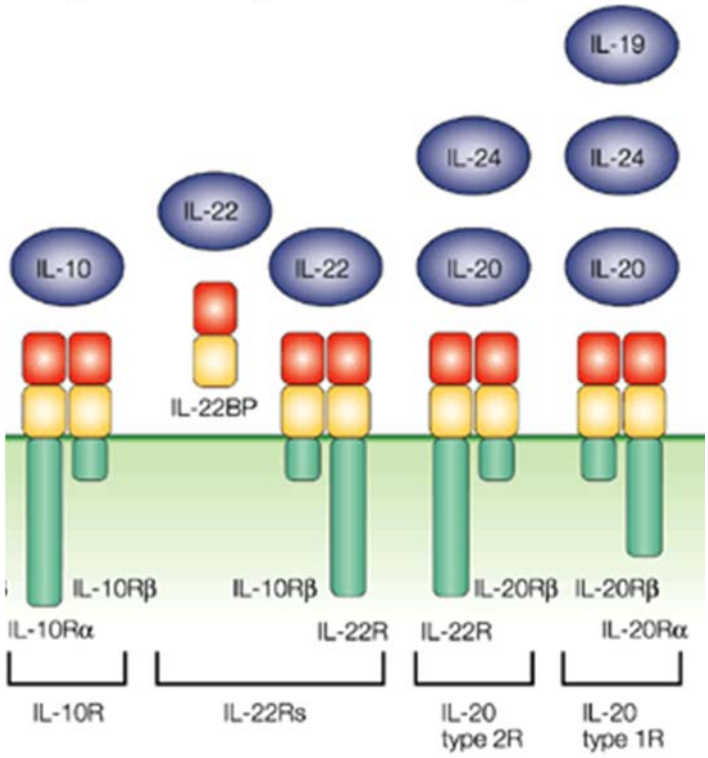


Figure 15 : Représentation schématique des différentes combinaisons de chaines de récepteurs de la famille de l'IL'10 fonctionnels et de leurs ligands (modifiée d'après Renauld, 2003).

La transduction du signal médié par ces récepteurs passe principalement par la voie JAK-STAT. Toutes les chaines de ces récepteurs peuvent potentiellement s'associer avec un membre de la famille JAK qui s'active lorsqu'un ligand se lie au récepteur. Dans ce cas, le récepteur est phosphorylé et crée des sites d'ancrage pour les protéines STAT qui sont à leur tour phosphorylées sur résidus tyrosines par les protéines JAK. Ce processus entraine la dimérisation puis la translocation nucléaire de ces protéines STAT. D'autres voies peuvent également être activées, telles que la voie de MAPK qui implique les kinases ERK, JNK et p38 (figure 16).

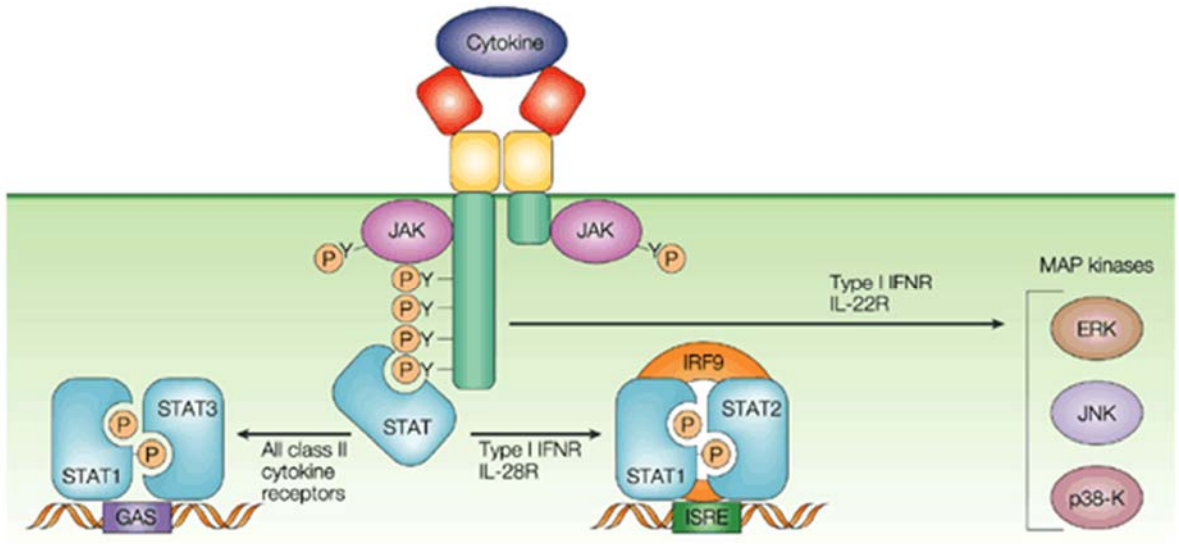


Figure 16 : Représentation schématique des voies de signalisation activées par les récepteurs aux cytokines de classe II (modifiée d'après Renauld, 2003)

2 Fonctions biologiques des cytokines de classe II

Bien que ces cytokines possèdent des similarités structurales et partagent des récepteurs communs, elles semblent avoir des rôles physiologiques divergents. Cette divergence est due au fait que l'activité biologique dépend essentiellement des domaines cytoplasmiques de ces récepteurs et des voies de signalisation activées (Wolk et al., 2002).

Le profil d'expression des différentes chaînes de récepteur est également un facteur déterminant (Kunz et al., 2006). Ainsi par exemple, on trouve une forte expression des différentes chaînes des récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-10 dans la peau. Par exemple, les souris exprimant de manière constitutive l'IL-20 meurent quelques jours après la naissance. Des analyses histologiques montrent un fort épaississement de l'épiderme

caractérisé par une augmentation du nombre de kératinocytes et l'expression de marqueurs de différentiation et de prolifération dans les couches supra-basale alors que ceux-ci sont normalement confinés à la couche basale (Blumberg et al., 2001). Ces observations rappellent celles trouvées dans les lésions de peau de patients atteints de psoriasis. Une forte expression des chaînes de récepteur IL-20Rα et IL-20Rβ est retrouvée chez ces patients, et il semblerait que l'IL-20 joue un rôle dans la physiopathologie de cette maladie. Au contraire, des souris transgéniques pour l'IL-19 ne présentent pas le même phénotype que les souris transgéniques pour l'IL-20 (Parrish-Novak et al., 2002). Or, l'IL-19 peut se lier à l'hétérodimère IL-20Rα/IL-20Rβ (IL-20R de type I) mais pas IL-20Rβ/IL-22Rα1 (IL-20R de type II). Il semblerait donc que le récepteur IL-20R de type II soit responsable du phénotype au niveau de la peau. D'ailleurs, des souris transgéniques pour la chaîne IL-22R semblent présenter des anomalies au niveau de la peau concernant la régulation de la différentiation et de la prolifération des kératinocytes (Renauld, 2003).

2.1. IL-10

L'IL-10 a été initialement caractérisé comme une cytokine produite par les cellules sanguines (surtout les monocytes). Chez la souris, l'IL-10 est produite par les cellules Th2 activées par la concanavaline A. Elle est capable d'inhiber la production de cytokines telles que l'IL-2, TNF-α, l'IFN-γ et le GM-CSF par les cellules Th1 (Fiorentino et al., 1989). Il a ensuite été décrit que les cellules B normales et les cellules des lymphomes B pouvaient également produire de l'IL-10 (O'Garra et al., 1990). Un homologue viral (IL-10v) a été identifié dans le génome du virus d'Epstein-Barr (EBV) visant à limiter l'inflammation et l'apoptose cellulaire, à améliorer sa survie et en conséquence à faciliter sa dissémination dans l'organisme (Moore et al., 1990). Il a été alors très vite envisagé que l'IL-10 avait un rôle suppresseur des réponses immunitaires.

L'IL-10 active une large gamme de fonctions une fois fixée sur son récepteur. On a initialement supposé que le mécanisme d'action de l'IL-10, en tant qu'inhibiteur de production de cytokines, était du à une inhibition de la présentation antigénique par les macrophages (Ding and Shevach, 1992) et par les DC (Enk et al., 1993; Fiorentino et al., 1991; Macatonia et al., 1993; Péguet-Navarro et al., 1994). Des recherches ultérieurs ont montré que l'IL-10 pouvait également bloquer la production de cytokines (Fiorentino et al., 1991), la production de molécules co-stimulatrices (telles que CD80, CD86, le CMH II) (Ding et al., 1993; Willems et al., 1994) et de la sécrétion de chimiokines (Jinquan et al., 1993;

Kasama et al., 1994). Elle modifie également l'expression des récepteurs aux chimiokines (Sozzani et al., 1998; Takayama et al., 2001), augmente l'expression du ligand de la β2-intégrine (ICAM-1) (Willems et al., 1994) et la génération des radicaux libres (Dokka et al., 2001). Ces actions de l'IL-10 limitent l'amplitude d'activation et dès lors, la sécrétion de cytokines (l'IFN-γ, l'IL-2, le TNF-α et l'IL-4) par les cellules T lors de la réponse immune spécifique. En plus d'affecter la réponse T, il a été démontré que l'IL-10 favorise le développement des cellules B1 (Ishida et al., 1992), ainsi que la survie des cellules B (Levy and Brouet, 1994) et des cellules T (Cohen et al., 1997). Enfin, on a récemment découvert que l'IL-10 pouvait promouvoir l'activité des cellules NK (Cai et al., 1999).

L'IL-10 joue également un rôle essentiel dans la régulation négative des réponses inflammatoires. Il a été en effet démontré que différents types de cellules Th (Th1, Th2, Th17, Tregs….) peuvent produire de l'IL-10 dans certaines conditions. Un concept proposé met en jeu l'IL-10 comme moyen de rétrocontrôle négatif des réponses inflammatoires en général (Anderson et al., 2007; Jankovic et al., 2007; Murugaiyan et al., 2009; Trinchieri, 2007).

Les souris dépourvues d'IL-10 présentent, de manière spontanée, une entérocolite et divers symptômes observés chez des patients atteints de colite inflammatoire (Kühn et al., 1993), lorsqu'elles sont élevées dans un environnement normal (au contraire de « germ free »). Ceci indique que l'IL-10 régule l'inflammation induite par les bactéries commensales du tube digestif. Concernant la réponse immunitaire, les souris IL-$10^{-/-}$ présentent une augmentation des réponses Th1 (Murray and Young, 1999; Sewnath et al., 2001; Yang et al., 1999), anti-fongique (Vazquez-Torres et al., 1999) ou anti-toxoplasmique (Gazzinelli et al., 1996). Paradoxalement, ces souris présentent également des réponses de type allergique (cutanées ou respiratoires) (Berg et al., 1995; Grünig et al., 1997; Tournoy et al., 2000). Ces résultats montrent le rôle immunomodulateur important de l'IL-10 dans la régulation des réponses inflammatoires en général. Une autre étude a montré que l'IL-10 induit la différentiation des DCs $CD11c^{low}$ $CD45RB^{high}$ qui dirigent la différentiation des cellules T régulatrices de type 1 (Tr1), aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Wakkach et al., 2003). Les cellules Tr1 elles mêmes sont une source très importante d'IL-10.

Chez l'homme, l'IL-10 est une molécule de survie des LB péritonéaux ainsi que des cellules B1-like $CD5^{+}$ (Gary-Gouy et al., 2002).

2.2. Mda-7/IL-24

2.2.a. Structure du gène Mda-7/IL-24

Le cDNA de Mda-7 possède une longueur de 1718 pb et code pour un polypeptide de 206 acides aminés. Mda-7 est une protéine d'environ 23.8 kDa. La région 3' UTR possède trois éléments consensus (AUUUA), probablement impliqués dans la stabilité de l'ARN, ainsi que trois séquences de polyadénylation (AAUAAA) (Jiang et al., 1996).

Le gène Mda-7 est localisé en 1q32 à l'intérieur d'un cluster comprenant quatre gènes de la famille de l'IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20 et Mda-7/IL-24) sur 195 kb (Figure 14, page 45) (Huang et al., 2001). Il est composé de sept exons et de six introns (Huang et al., 2001). Comme pour IL-19, les deux premiers exons possèdent chacun un codon ATG initiateur de traduction (Met_{UP} et Met) correspondant à l'acide aminé méthionine (Figure 17a, page suivante) (Kotenko, 2002). L'épissage alternatif du deuxième exon (exon 1a) permet la génération de deux messagers différents (Figure 17b, page suivante). Lorsque le premier codon start est impliqué (Met_{UP}), la protéine est traduite avec un peptide signal riche en aa hydrophiles plus long sur sa région N-terminale, ce qui a pour effet de diminuer significativement la sécrétion de cette protéine, conduisant de ce fait à la production d'une protéine intracellulaire. En revanche, lorsque la traduction débute à partir du deuxième codon start (Met), la protéine générée possède un peptide signal plutôt hydrophobe, constitué par 49 acides aminés, permettant à la molécule d'être clivée et sécrétée (Figure 17b) (Hang et al., 2001).

Mda-7 possède trois sites de glycosylation au niveau des acides aminés 95, 109 et 126 permettant la production d'une protéine sécrétée avec différent poids moléculaires possibles (Caudell et al., 2002) (Figure 17c, page suivante). Des analyses structurales indiquent que le Mda-7 est un membre des cytokines à quatre hélices α de la famille de l'IL-10 (Wang et al., 2002). Bien que Mda-7 et IL-10 ne partagent que 23% d'identité de séquence (Figure 13, page 44), Mda-7 possède une séquence signature de l'IL-10 qui permet de la classer parmi les cytokines de cette sous-famille.

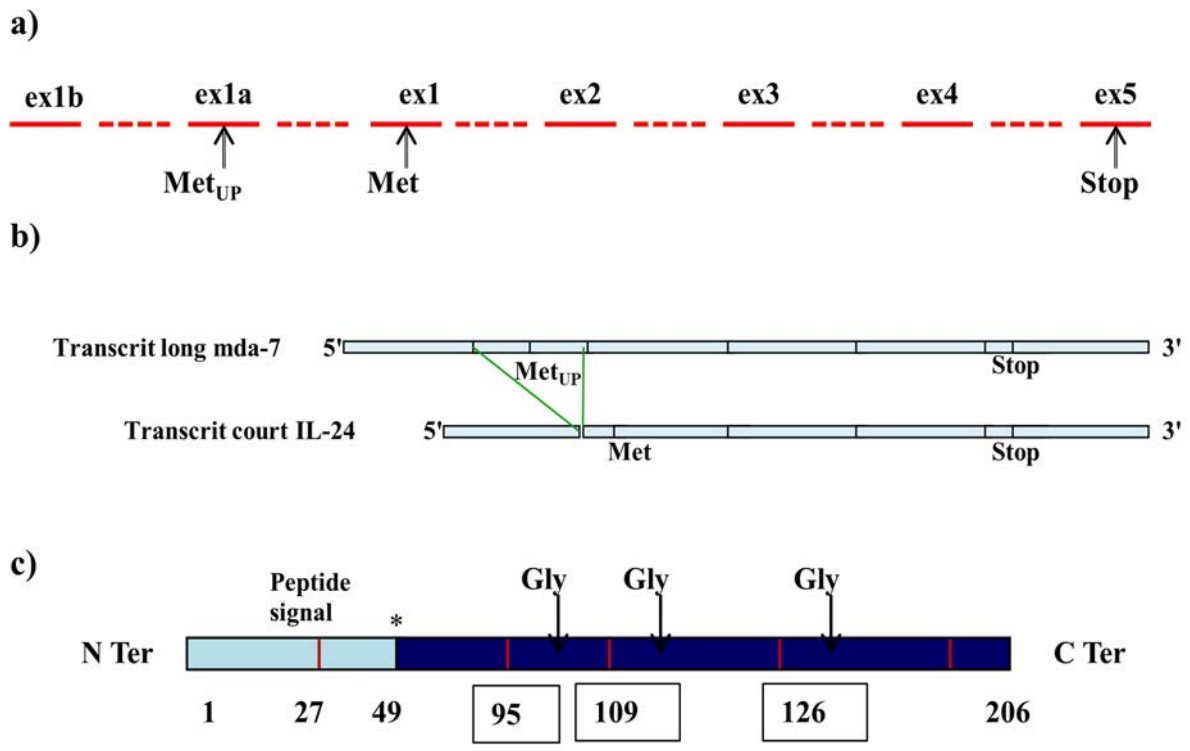


Figure 17 : Structure du gène de Mda-7/IL-24 ; a) nomenclature exonique ; b) épissage alternatif du transcrit Mda-7/IL-24 ; c) les sites de glycosylation sont désignés par Gly et l'acide aminé correspondant encadré (D'après Huang et al., 2001 ; Kotenko et al., 2002)

2.2.b. Expression de Mda-7/IL-24

L'analyse du profil d'expression de Mda-7 dans différents tissus a démontré que son expression était particulièrement restreinte aux tissus associés au système immunitaire tels que la rate, le thymus et les leucocytes du sang périphérique (Huang et al., 2001), mais également dans la peau, essentiellement dans les mélanocytes normaux (Ekmekcioglu et al., 2001; Jiang et al., 1995). Sur la base de ces observations, Mda-7 a été renommée IL-24 par le système de nomenclature de HUman Gene Organisation (HUGO). La régulation de l'expression de Mda-7/IL-24 durant la phase de différentiation terminale s'opère essentiellement au niveau post-transcriptionnel (Madireddi et al., 2000a, 2000b). Le co-traitement par IFN-β et Mezeréine induit une stabilité des transcrits Mda-7/IL-24. Au niveau transcriptionnel, l'expression de Mda-7/IL-24 est principalement régulée par deux facteurs de transcription, AP-1 et C/EBP (Madireddi et al., 2000a).

D'après l'hypothèse soutenue par Fisher et al, Mda-7/IL-24 posséderait deux activités biologiques distinctes. A des faibles concentrations (entre 2 et 20 ng/ml), Mda-7/IL-24 agit en tant que cytokine, en induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α et INF-γ) par les PBMC (Caudell et al., 2002). En revanche, à des fortes concentrations

(lorsque Mda-7/IL-24 est exprimé fortement à l'aide d'un système de vectorisation adénoviral), Mda-7/IL-24 agit comme un facteur d'induction de l'apoptose de manière sélective dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules normales (Jiang et al., 1996; Madireddi et al., 2000c; Mhashilkar et al., 2001; Sarkar et al., 2002a). Sur la base de ces propriétés intéressantes, Mda-7/IL-24 est devenu la cible d'intenses recherches, notamment dans le domaine de traitements anti-cancers.

2.2.c. Orthologues de Mda-7/IL-24

La découverte d'orthologues de Mda-7/IL-24 indique que cette protéine joue un rôle complexe. Deux équipes ont cloné de manière indépendante Mda-7/IL-24 chez le rat sous le nom de C49a et Mob-5 (Soo et al., 1999; Zhang et al., 2000). Le gène Mda-7/IL-24 du rat code pour une protéine de 183 acides aminés avec 58,7 % d'identité avec la protéine humaine. L'expression de C49a est augmentée durant le processus de réparation de blessure dans les cellules du derme chez des rats blessés. Mob-5 est induit dans des cellules possédant une molécule de Ras oncogénique.

L'orthologue de Mda-7/IL-24 chez la souris, appelé Fisp (IL-4 induced secreted protein), code pour une protéine de 220 acides aminés avec 93% d'identité avec Mob-5/C49a et 69% avec Mda-7/IL-24 humain (Schaefer et al., 2001). L'expression de Fisp est induite durant la différentiation des lymphocytes Th2, ainsi que par le signal transduit *via* le récepteur T à l'antigène, impliquant l'activation de la protéine kinase C et le signal du récepteur à l'IL-4 STAT6 dépendant. Mda-7/IL-24 et Fisp partagent certaines propriétés telles qu'une expression essentiellement localisée dans le système immunitaire. De plus, l'expression de ces deux orthologues est induite durant le processus de différentiation et lors d'un traitement par une cytokine (INF-β ou IL-4) et d'un activateur de la protéine kinase C (PMA). Bien que le rôle de Fisp ne soit pas encore connu, il semble avoir un rôle plus proche de celui de son orthologue humain Mda-7/IL-24 que ne l'est C49a/Mob-5.

2.2.d. Récepteurs de Mda-7/IL-24

En transfectant les cellules avec différentes combinaisons de chaînes de récepteurs de la famille de l'IL-10 et en réalisant des test de fixation avec la protéine IL-24, il a été possible de déterminer les récepteurs pouvant lier l'IL24 (Dumoutier et al., 2001; Parrish-Novak et al., 2002; Wang et al., 2002). Il s'agit des hétérodimères IL-20R1/IL-20R2 et/ou IL-22R1/IL-20R2 (Figure 15). Ces hétérodimères sont donc tous constitués de la chaîne commune IL-20R2, possédant une région cytoplasmique courte, qui peut s'associer avec une autre chaîne

possédant un domaine cytoplasmique long : soit avec la chaîne IL-20R1 pour former le récepteur IL-20 de type 1, soit avec chaîne IL-22R1, pour former le récepteur IL-20 de type 2 (Figure 15) (Wang and Liang, 2005). Des tests de retard sur gel réalisés sur une lignée de kératinocytes humains ont révélé que, comme les autres cytokines membres de la famille de l'IL-10, l'IL-24 induit l'activation de STAT, notamment STAT1 et STAT3 (Wang et al., 2002). La phosphorylation de STAT3 a également été démontrée par des techniques de Western Blot après traitement avec l'IL-24 (Dumoutier et al., 2001).

2.2.e. Rôle de Mda-7/IL-24 dans le système immunitaire

Le rôle potentiel de Mda-7/IL-24 en tant que cytokine et ses implications dans le système immunitaire commencent à être mieux élucidé. L'expression de Mda-7/IL-24 a pu être induite dans des PBMC humains après activation avec PHA (phytohémagglutinine) ou LPS (Caudell et al., 2002) ainsi que dans des macrophages alvéolaires de rat stimulés par du LPS ou de l'IL-4 (Garn et al., 2002). De plus, l'expression de Mda-7/IL-24 a pu être détectée par PCR en temps réel dans des mélanocytes humains et son expression augmentée après traitement avec LPS ou dans des cellules T, plus particulièrement dans des cellules T naïves et mémoires (T $CD44^+$) après activation via anti-CD3 (Wolk et al., 2002).

Chez la souris, Fisp semble avoir une expression exclusive dans les lymphocytes T $CD4^+$ de type Th2 (Schaefer et al., 2001). Néanmoins, chez l'homme, le profil d'expression de Mda-7/IL-24 dans les cellules T est différent de celui observé chez la souris. A des temps précoces (6h), l'expression de Mda-7/IL-24 est inhibée en cas de différentiation vers un profil Th1 (médiateurs de l'immunité cellulaire), son expression étant légèrement augmentée dans des cellules différenciées Th2 (régulateurs de la réponse humorale). A 66h, l'expression augmente dans les cellules différenciées en Th1 (Wolk et al., 2002).

Si on ajoute à des PBMC humains en culture de l'IL-24, on induit la production de l'IL-6, l'IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-12 et de GM-CSF par ces cellules (Caudell et al., 2002). Cette induction peut être bloquée par l'ajout d'IL-10 de manière concomitante et implique que l'IL-10 est un antagoniste de l'IL-24. Ceci pourrait être dû au fait que l'IL-10 puisse partager des sous-unités de récepteur avec Mda-7/IL-24 ainsi qu'au fait que l'IL-10 possède une affinité pour ses récepteurs 10 fois supérieure à celle de l'IL-24 pour les siens.

L'hypothèse selon laquelle les cytokines secondaires induites par l'IL-24 pouvaient augmenter la présentation d'antigènes tumoraux par les cellules cancéreuses et de ce fait la réponse immune anti-tumorale a été émise par Caudell *et al.* (Caudell et al., 2002).

L'expression de Mda-7/IL-24 peut être détectée dans les mélanocytes, mais elle diminue graduellement en fonction de la progression du mélanome vers des stades plus agressifs, tels que pendant les phases de prolifération radiales et verticales. Mda-7/IL-24 est d'ailleurs complètement absent dans les mélanomes métastasiques (Ekmekcioglu et al., 2001; Ellerhorst et al., 2002; Jiang et al., 1995). La perte d'expression de Mda-7/IL-24 pourrait contribuer à la perte d'efficacité de la réponse immune vis-à-vis du mélanome. Une autre observation intéressante montre que l'expression de Mda-7/IL-24 peut être induite dans les monocytes humains après infection par le virus de la grippe A (A/PR/8). Ceci suggère un rôle potentiel de Mda-7/IL-24 dans la réponse immune antivirale (Garn et al., 2002).

2.2.f. Rôle de Mda-7/IL-24 dans le cancer

Une des fonctions potentiellement les plus intéressantes de Mda-7/IL-24 est son rôle anti-tumoral. Lorsque le Mda-7/IL-24 est délivré dans les cellules cancéreuses via un vecteur adénoviral à réplication incompétente (Ad.Mda-7), il induit l'apoptose sur une très grande variété de lignées cancéreuses telles que celles retrouvées dans les mélanomes, les glioblastomes multiformes, les ostéosarcomes et les carcinomes de sein, prostate, colon, foie, poumons, nasopharynx, cervical et ovaire. Ceci indépendamment du statut des gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, p16INK4A ou Rb (Sarkar et al., 2002b; Sauane et al., 2003b). Dans les gliomes malins, le Mda-7/IL-24 induit l'apoptose aussi bien chez des cellules avec un gène p53 sauvage ou muté. De ce point de vue, le Mda-7 peut s'avérer être un candidat intéressant pour une thérapie génique de ce type de cancer en particulier (Su et al., 2003). Notons que l'IL-24 n'est pas secrétée dans ces modèles. L'infection par un Ad.Mda-7 ainsi qu'un traitement avec une protéine GST-Mda-7 purifiée peut sensibiliser les cellules de gliome aux effets antiprolifératifs des rayons ionisants. Une exception intéressante à l'effet anti-tumoral d'Ad.Mda-7 est observée dans des cellules pancréatiques cancéreuses qui présentent souvent de nombreuses mutations génétiques conduisant à l'activation de l'oncogène K-ras. Néanmoins, la combinaison de Ad.Mda-7 avec un oligonucléotide anti-sens K-ras conduit à l'apoptose des cellules de cancer pancréatique présentant un K-ras muté mais pas sur celles présentant un K-ras sauvage (Su et al., 2001). A l'inverse, l'infection par Ad.Mda-7 n'a pas d'influence sur la prolifération d'une grande variété de cellules normales telles que les fibroblastes humains, les cellules épithéliales mammaires, bronchiques, rénales et de la prostate, les mélanocytes, les astrocytes et les cellules endothéliales vasculaires (Su et al., 2001).

L'infection par le Ad.Mda-7 conduit à une inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et /ou Bcl-xL et l'augmentation des protéines pro-apoptotiques Bax et/ou Bak, principalement dans différentes cellules cancéreuses mais pas dans les cellules normales (Lebedeva et al., 2002). De manière intéressante, la forte expression de Bcl-2 et/ou Bcl-xL dans les cellules du cancer de la prostate protège ces cellules de l'apoptose médiée par Ad.Mda-7. Ceci pourrait indiquer que l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques est un facteur déterminant dans le mécanisme d'apoptose induite par Ad.Mda-7 (Lebedeva et al., 2003).

Dans les cellules de mélanome et de gliome, mais pas dans leur contrepartie normale, l'induction de l'apoptose par Ad.Mda-7 est médiée par l'activation de la voie p38 MAPK qui aboutit à l'induction des protéines GADD (Growth Arrest and DNA Damage) telles que GADD153, GADD45 et GADD34 (Sarkar et al., 2002b; Su et al., 2003). Dans un modèle de cancer du poumon, il a été montré que l'apoptose induite par Ad.Mda-7 est médiée par l'augmentation et l'activation de la protéine kinase dépendante de l'ARN double brin, la PKR (Pataer et al., 2002). L'activation de la PKR active également la p38 MAPK, ce qui semble indiquer que la voie p38 MAPK est essentielle pour l'induction de l'apoptose médiée par Ad.Mda-7. De plus, l'infection par Ad.Mda-7 supprime l'expression de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) qui est essentielle à la survie des cellules de mélanome mais pas aux mélanocytes (Ekmekcioglu et al., 2003). Ces observations indiquent que l'Ad.Mda-7 peut induire l'apoptose chez différentes cellules cancéreuses par divers mécanismes. Enfin, en plus de son rôle directe dans l'apoptose des cellules cancéreuses, Ad.Mda-7 inhibe également la croissance et la progression de la tumeur en inhibant l'angiogénèse (Saeki et al., 2002). Une observation intéressante est que l'apoptose induites par Ad.Mda-7 ne semble pas requérir l'activation de la voie JAK-STAT car dans ces modèles l'IL-24 n'est pas secrétée. Il n'existe aucune corrélation entre l'induction de l'apoptose et l'expression des chaînes des récepteurs IL-20/IL-22 (Sauane et al., 2003a). Les différentes équipes travaillant sur Ad.Mda-7 ont donc conclu qu'il existait une dichotomie entre la fonction de Mda-7/IL-24 en tant qu'inducteur d'apoptose et les fonctions de la forme secretée.

Cependant, notre équipe a démontré lors de travaux utilisant une forme recombinante de l'IL-24 que Mda-7/IL-24 peut également jouer un rôle dans la balance survie/apoptose lorsqu'elle est secrétée, et ceci sur des lymphocytes B humains normaux et leucémiques (Sainz-Perez et al., 2008).

APOPTOSE

1 Généralités sur le processus d'apoptose

1.1. Définition

Il existe deux types principaux de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose.

La **nécrose** est le résultat d'une agression environnementale des cellules (exposition à un produit toxique, une infection virale ou bactérienne). Elle est considérée comme une mort cellulaire désordonnée. La rupture de la membrane cytoplasmique libère le contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire et déclenche une réaction inflammatoire.

L'**apoptose** ou « mort cellulaire programmée », est un mode d'élimination physiologique des cellules en excès ou anormales dans l'organisme. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui va induire la destruction d'une cellule, tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Kerr et al (Kerr et al., 1972). L'apoptose est caractérisée par un certain nombre de modifications :

- morphologiques : diminution du volume cellulaire, maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, relocalisation des organites cytoplasmiques, condensation de la chromatine puis fragmentation du noyau (figure 19).

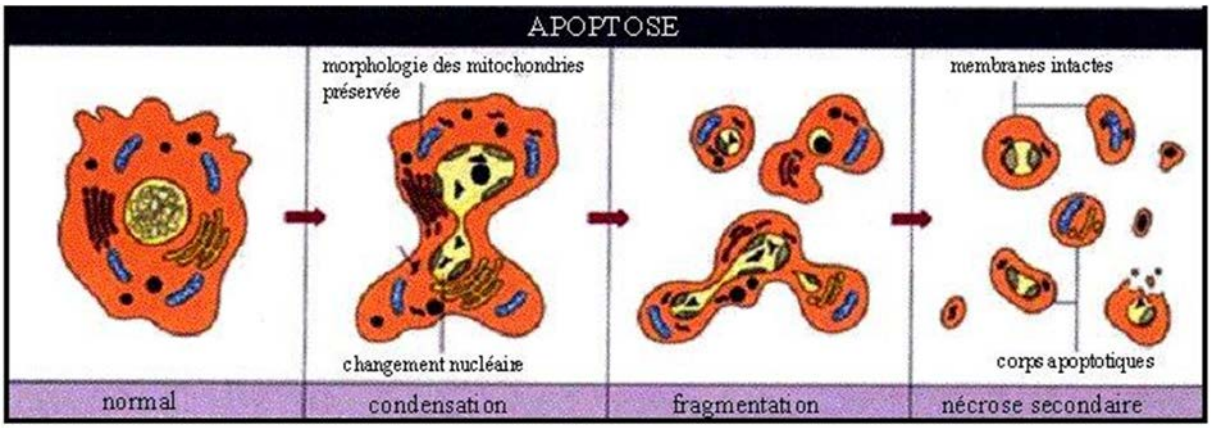


Figure 19 : modifications morphologiques au cours de l'apoptose (d'après le web)

- biochimiques : chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, externalisation de lipides membranaires (phosphatidylsérines), activation des caspases et fragmentation de l'ADN. L'exposition des phosphatidylsérines est reconnue par les macrophages pour la phagocytose (Messmer and Pfeilschifter, 2000).

Les acteurs moléculaires de l'apoptose sont :

- Les récepteurs membranaires de mort « Death receptors » (Fas, TNFR et TRAIL)
- Les protéines cytoplasmiques :
  - Caspases
  - Apaf-1
  - IAP, protéine régulatrice des caspases
  - cFLIP, protéine régulatrice de la voie extrinsèque
- Les protéines mitochondriales
  - Cytochrome C
  - Protéines régulatrices des IAPs : Smac/DIABLO, Omi/HtrA2
  - AIF, endoG
- Les protéines de la famille Bcl-2 (pro-apoptotiques, ex : Bid, Bax, Bak, Bim…..)
- La protéine p53

1.2. Rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme régulateur essentiel à l'intégrité tissulaire qui intervient dans l'homéostasie cellulaire, et constitue le type de mort cellulaire tout désigné pour l'élimination des cellules excédentaires ou « nuisibles ». Cette mort physiologique douce a un rôle fondamental notamment au cours du développement embryonnaire et fœtal, dans l'organisation du système nerveux central, ainsi que dans l'élaboration du système immunitaire (Opferman and Korsmeyer, 2003). Sa dérégulation peut mener à de nombreuses pathologies. Pour exemple, les cancers et certaines maladies auto-immunes présentent des défauts d'apoptose. Au contraire une sur-activation de l'apoptose est observée dans d'autres maladies comme certaines maladies neuro-dégénératives ou des désordres immunitaires comme le SIDA (Danial and Korsmeyer, 2004; Elmore, 2007; Gougeon, 2003). Ainsi, un intérêt croissant est constaté dans la compréhension des mécanismes régulant les voies apoptotiques à visée thérapeutique, notamment dans les futurs traitements des cancers comme ceux d'origine hématopoïétique. Ces enjeux expliquent que l'apoptose soit aussi la forme la plus étudiée et décrite parmi les programmes de mort cellulaire.

1.3. Les différentes voies de l'apoptose

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose. La première est la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) (figure 20, page suivante). La deuxième voie

est la voie mitochondriale (voie intrinsèque) mettant en jeu la mitochondrie (figure 21, page suivante). Ces deux voies aboutissent à l'activation des molécules effectrices de l'apoptose, les caspases. Une connexion entre ces deux voies existe à travers le clivage et l'activation de BID. Toutefois, il existe une troisième voie activée en réponse à un stress et faisant intervenir le réticulum endoplasmique (RE) (figure 21, page suivante).

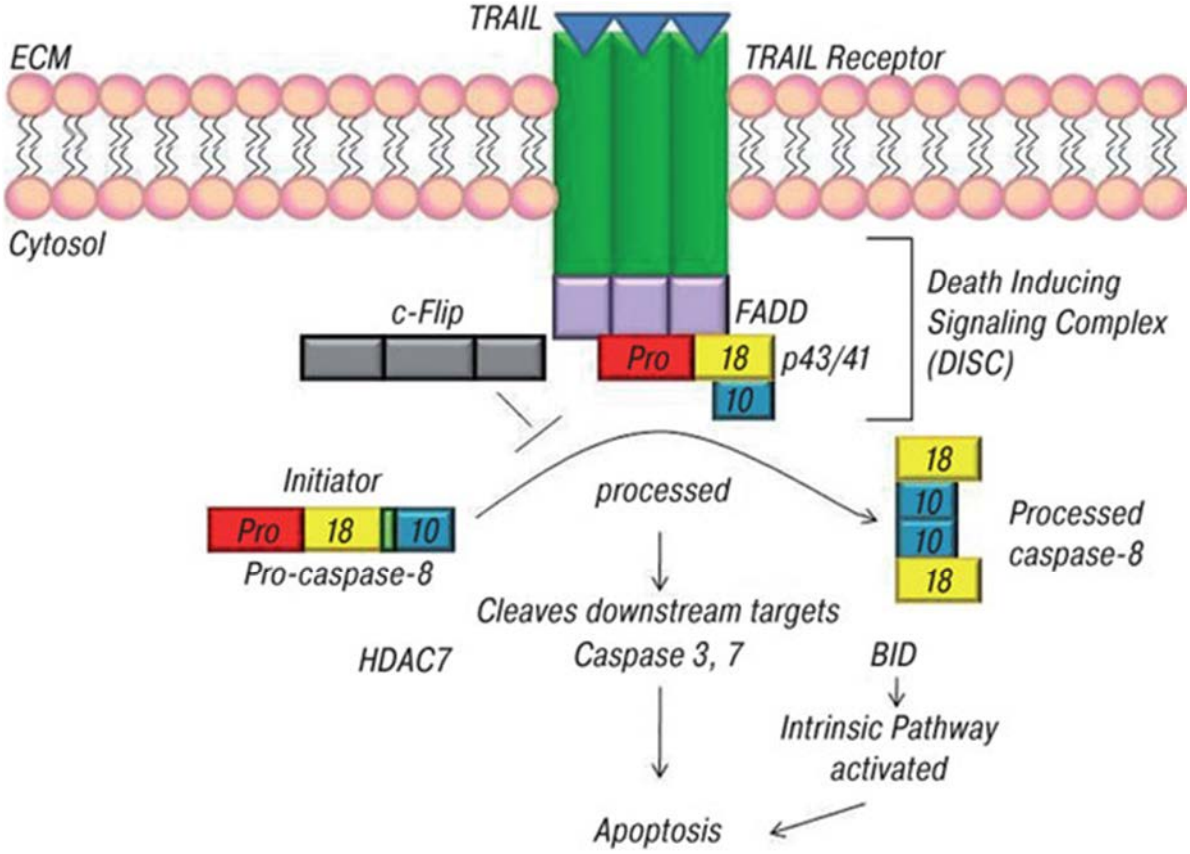


Figure 20 : La voie extrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par la reconnaissance des récepteurs de mort (TNF-R1, Fas/CD95/Apo-1/DR2, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5) par leurs ligands respectivement (TNF-alpha, FasL/CD95L/Apo-1L, TRAIL/Apo-2L, TRAIL/Apo-2L) (Wallach et al., 2008). Cette reconnaissance permet le recrutement de la protéine adaptatrice, FADD puis de la caspase 8, entraînant sa dimérisation et son activation (Wang et al., 2008). Ainsi, le clivage et l'activation des caspases 3 et 7 peuvent en découler directement et conduire à l'apoptose (Yuan and Kroemer, 2010).

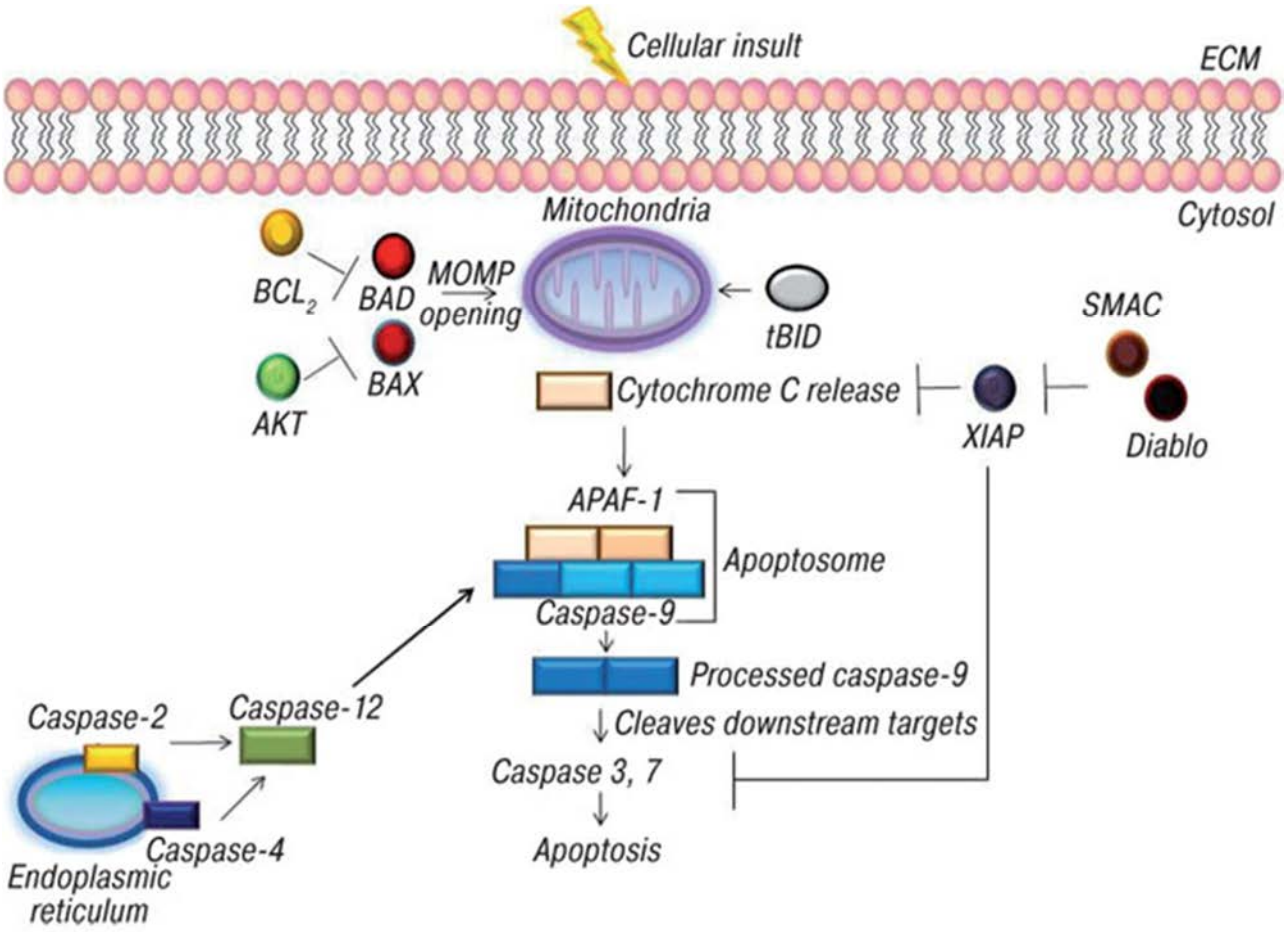


Figure 21 : Les voies intrinsèques et de stress du RE (Reticulum Endoplasmique) de l'apoptose.

La voie intrinsèque de l'apoptose, activée par différents stimuli apoptotiques intracellulaires, conduit à une régulation négative des protéines anti-apoptotique comme XIAP (inhibiteurs de caspase) et les protéines de la famille Bcl-2(Bcl-2, BCL-xL), et une activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bad, Bid), SMAC et Diablo, induisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP). Celle-ci entraîne le relargage de diverses protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS (exemple : cytochrome C). Le cytochrome c ainsi libéré se lie avec l'APAF-1 et la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome (Siu et al., 2008). La caspase-9 est alors activée, permettant le clivage en aval des caspase-3 et -7 (Ohtsuka et al., 2003).

La voie de stress du RE induit l'activation de la caspase-2 ou -4, conduisant à l'activation des caspases-12, qui activent alors la voie intrinsèque de l'apoptose (Lai et al., 2007).

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS

Notre équipe a précédemment montré que Mda7/IL-24 est surexprimé dans les lymphocytes B de la leucémie lymphoïde chronique, mais en y jouant un rôle protecteur (Sainz-Perez et al., 2006). Ceci est en accord avec le fait que la majorité des cellules de LLC dans le sang sont en phase G0/G1 précoce du cycle cellulaire. Par contre, l'IL-24 recombinante provoque l'apoptose de cellules leucémiques en culture après stimulation par l'IL-2 (Sainz-Perez et al., 2008). Ceci indique que l'IL-24 recombinante tue les cellules mises en cycle. De plus, nous avons également montré que l'IL-24 recombinante inhibe la différentiation plasmocytaire des cellules B normales du centre germinatif en tuant surtout les précurseurs plasmatiques (Maarof et al., 2010). Finalement, ces observations suggèrent que l'expression de l'IL-24 est inversement corrélée à la prolifération cellulaire. Cependant, les mécanismes moléculaires de l'action antiproliférative de l'IL-24 sur les cellules B humaines restaient à mettre en évidence. Les objectifs de ma thèse ont donc été :

1) d'analyser les mécanismes moléculaires de l'action de cette cytokine sur les cellules B normales ainsi que sur celles de la leucémie lymphoïde chronique,

2) de mettre en évidence les mécanismes physiologiques de production de l'IL-24 dans les lymphocytes,

3) d'explorer les effets immunologiques potentiels de cette cytokine en dehors de l'effet cytostatique et cytotoxique.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé plusieurs méthodes :

1. Sélection des lymphocytes B humains (à partir des amygdales et du sang de LLC)
2. Culture des Lymphocytes B avec ou sans IL-24
3. Extraction des ARN
4. Hybridation de Biopuces à ADN
5. Analyse du Transcriptome
6. Confirmation de l'expression des gènes par PCR et q-PCR
7. Etudes fonctionnelles des lymphocytes B (Prolifération en CFSE, cycle cellulaire, apoptose, expression des protéines en Western Blot).

Nous décrivons ci-après les différentes techniques utilisées :

1 Première partie : les modèles d'étude

1.1. Les cellules B d'amygdales

1.1.a. Préparation des suspensions amygdaliennes

Les amygdales constituent une source importante de lymphocytes B matures (cf introduction) où ils représentent 60 à 80 % de cellules totales. Nous avons choisi de nous intéresser aux organes lymphoïdes secondaires que constituent les amygdales palatines (composées en majorité de cellules de centres germinatifs) qui, par leur emplacement, sont mises en cause lors d'infections à répétition ou peuvent présenter chez le jeune enfant une hypertrophie gênante conduisant à prescrire leur ablation.

Les amygdales palatines obtenues lors d'une amygdalectomie thérapeutique chez 40 enfants âgés de 1 à 10 ans (moyenne d'âge de 4,6± 0,3 ans) ont été incluses dans cette étude. Ces amygdales, enveloppées dans une compresse imbibée de sérum physiologique, ont été acheminées du Bloc Opératoire de l'Hôpital d'Enfant de Nancy au laboratoire immédiatement après l'intervention chirurgicale faite par le professeur COFFINET. Un fragment d'environ 0,5 cm^3 a été prélevé sur chaque échantillon de tissu frais et émincé à l'aide de ciseaux dans du RPMI 1640 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Les cellules ont été dissociées en utilisant un Potter en verre et les lymphocytes amygdaliens ont été isolés par centrifugation sur gradient de densité comme décrit dans le paragraphe ci-dessous.

1.1.b. Isolement des lymphocytes totaux

La séparation des lymphocytes à partir de sang périphérique ou de suspensions cellulaires amygdaliennes a été réalisée par centrifugation sur gradient de **Ficoll-Hypaque**.

Cette technique repose sur les différences de densité que présentent les globules rouge, les polynucléaires, les lymphocytes et les monocytes. Les éléments figurés du sang, placés sur un milieu Ficoll-Hypaque (Pancoll human, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Bavaria, Allemagne) de densité 1,077, correspondant à la densité des lymphocytes, subissent durant la centrifugation une migration différentielle qui conduit à leur séparation en plusieurs fractions. A l'interface entre le sang et le Ficoll-Hypaque, les érythrocytes sont agrégés en raison du grand nombre de polymères que contient le Ficoll-Hypaque. La densité des agrégats étant supérieure à celle du Ficoll-Hypaque, les érythrocytes sédimentent au fond du tube. La densité des granulocytes (plus sensibles que les lymphocytes aux variations de pression osmotique) s'élève dans une solution hyper osmotique et par conséquence ces polynucléaires sédimentent également au fond du tube. Les lymphocytes restent à l'interface échantillon/milieu de sédimentation et se rassemblent en un anneau opaque surnageant au dessus du Ficoll-Hypaque. Les monocytes se retrouvent dans la phase supérieure qui contient également le plasma riche en plaquettes (Bøyum, 1976).

Environ 10 ml de suspension cellulaire amygdalienne ou de sang total périphérique dilués au demi dans du RPMI 1640 sont déposés sur 10 ml de Ficoll-Hypaque sans mélanger les deux phases. L'ensemble est centrifugé à 600g pendant 15 minutes à température ambiante. Les lymphocytes sont ensuite recueillis en prélevant l'anneau cellulaire formé à l'interface, puis lavés deux fois dans du PBS (PAA GmbH, Pasching, Austria).

1.1.c. Comptage et étude de la viabilité cellulaire

Le comptage ainsi que l'estimation de la viabilité cellulaire à été réalisé par exclusion du bleu trypan. Ce dernier est un composé toxique qui pénètre dans les cellules. Les cellules vivantes sont capables d'expulser le bleu trypan dans le milieu extracellulaire grâce aux transporteurs ABC (pour ATP binding cassette). Ces protéines membranaires utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour expulser les molécules cytotoxiques hors de la cellule. Les cellules mortes, ne produisant plus d'ATP, sont incapables d'expulser le bleu trypan et apparaissent donc de couleur bleue.

Vingt microlitre de la suspension cellulaire amygdalienne ont été placés en présence du même volume du bleu trypan (dilué au 20ème) pendant 3 min. Les cellules vivantes excluant le bleu trypan sont comptées sur une cellule de Malassez.

1.1.d. Isolement des lymphocytes B

La séparation des lymphocytes B à partir des lymphocytes totaux du sang périphérique ou bien de suspensions amygdaliennes a été réalisée par sélection négative en utilisant un Kit de Billes Magnétiques (**Dynal® B Cell Negative Isolation Kit)**, comme dans les articles précédant de notre équipe.

Cette technique repose sur l'isolation indirecte des cellules B naïves humaines à partir d'une suspension amygdalienne ou bien de PBMC, par déplétion des toutes les cellules non B en utilisant, dans une première étape, un mélange d'anticorps de type IgG murins contre CD2 (lymphocytes T), CD14 (les monocytes), CD36 (plaquettes et monocytes), CD43 (leucocytes sauf cellules B naïves) et CD235a (Glycophorine A, érythrocytes), et dans une seconde étape, les cellules non B sont éliminées au moyen de billes magnétiques couplées avec des anticorps anti- IgG murins.

100µl d'une suspension amygdalienne contenant 10^7 cellules ont été incubées avec 10µl des anticorps mixtes pendant 30min à une température entre 4-8°c. Après lavage avec 2ml du PBS et centrifugation à 1600t/min pendant 5min, le culot obtenu a été suspendu avec 100µl de billes magnétiques lavées. Le volume est complété à 1ml avec du RPMI et incubé pendant 15 min à température ambiante, sur un rotateur. Après incubation, le tube a été placé sous un aimant pendant deux minutes et le surnageant est récupéré dans un nouveau tube. Finalement les cellules B obtenues ont été comptées sur cellule de **Malassez** puis analysées au cytomètre pour étudier leur pureté. La pureté moyenne était de 98% basée sur un marquage CD19 et CD5 en cytométrie en flux. En particulier, le double marquage CD19/CD5 permet d'analyser les cellules B $CD19^+CD5^-$ ou bien B $CD19^+CD5^+$. Ces dernières représentent, en moyenne, 10% des lymphocytes B (Gary-Gouy et al., 2002). La population $CD19^-/CD5^+$ représente les lymphocytes T résiduels contaminants (<2% dans nos analyses).

Nous avons également séparé les cellules B en fonction de plusieurs marqueurs de surface (figure 22, page suivante) : cellules B du CG ($CD20^{hi}CD38^{hi}$) (A) ; cellules B activées mémoires ($CD27^+CD38^-$) (C) ; plasmocytes ($CD38^{hi}CD27^{hi}$) (D) ; cellules B du CG ($CD38^+CD27^+$) (E) ; cellules B naïves ($CD 38^-CD27^-$) (F) ; centroblastes ($CD44^-IgD^-$) (G) ; cellules B naïves ($CD44^+IgD^+$) (H) ; centrocytes ($CD44^+IgD^-$) (I).

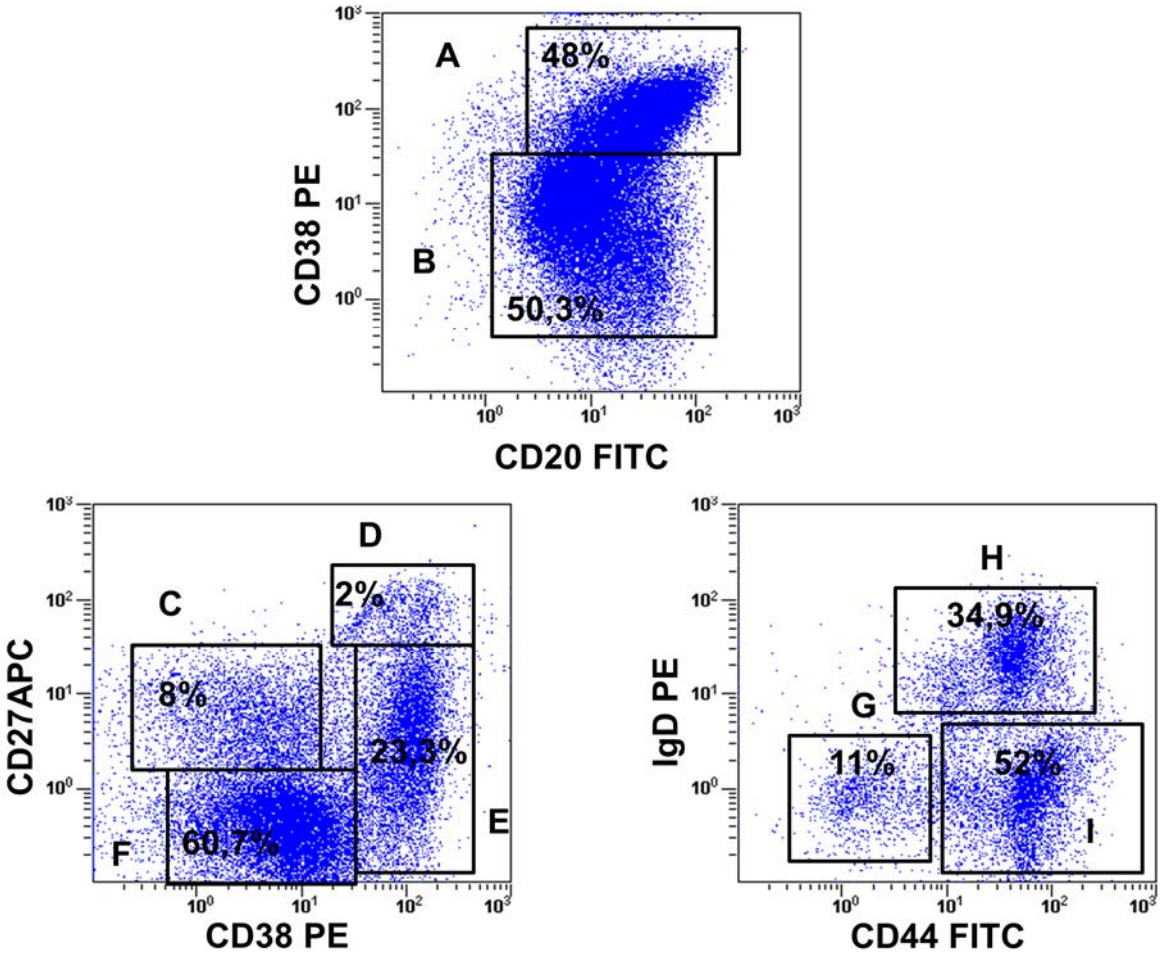


Figure 22 : Dot plots représentatives d'une amygdale après sélection des cellules B

1.1.e. Traitement et culture des lymphocytes B

Le travail de Maarof et al, avait montré un effet de l'IL-24r sur un modèle de différentiation *in vitro* des lymphocytes B en cellules B mémoires et en plasmocytes. Nous avons utilisé ce modèle décrit précédemment par l'équipe de YJ Liu et J Banchereau. L'objectif était l'analyse des mécanismes moléculaires de l'effet de l'IL-24. Nous avons utilisé cette culture pour l'analyse du « Transcriptome ». Dans ce modèle les cellules B du centre germinatif ont été cultivées pendant 3 jours en présence d'IL-2, IL-10 et CD40L, suivi d'une culture secondaire de 4 jours soit en présence des mêmes cytokines pour obtenir des cellules B mémoires ou bien en absence du signal CD40L pour obtenir des plasmocytes (Arpin et al., 1995) (figure 23, page suivante). La seule modification apportée dans notre travail a été l'utilisation d'un CD40L soluble trimérique. En effet, cette molécule permet de réticuler le CD40 à la surface des cellules B et est indispensable à leur différentiation (cf. introduction). Le CD40L trimérique a été utilisé car nous ne disposions pas des lignées de fibroblastes CD40L^{+} et des fibroblastes contrôles.

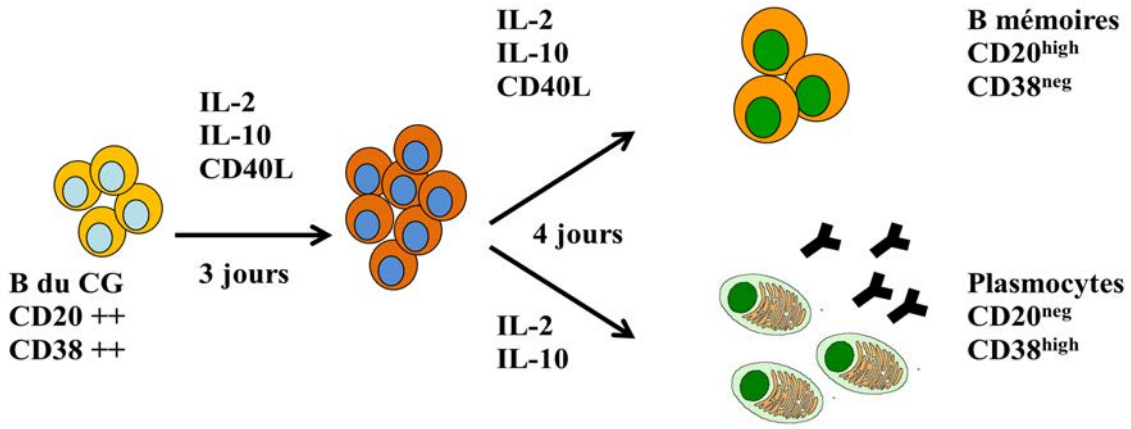


Figure 23 : le modèle de différenciation B in vitro mise au point par l'équipe de J.Banchereau (d'après Arpin et al., 1995)

Dans le but d'étudier le mécanisme moléculaire de l'IL-24 ainsi que de l'IGF1, des cellules B d'amygdales, obtenues par sélection négative (98% de pureté), ont été mises en culture primaire en présence d'un cocktail de cytokines : rIL-2(100ng /ml), rIL-10(50ng/ml) et CD40-ligand soluble (400ng/ml) pendant trois jours. A J4 ces cellules ont été mises en culture secondaire en présence de mêmes concentrations de rIL-2, rIL-10 avec ou sans rIL-24(100ng/ml) et avec ou sans rIGF1 (10 et 100 ng/ml) (dans les deux cas sans CD40-L).

Pour chaque manipulation, les suspensions cellulaires ont été placées dans un milieu de culture complet RPMI, contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaire à leur survie et dans des conditions optimales (atmosphère humide, enrichie en CO_2, à 37°C) en présence d'agent de stimulation. Ces cellules ont été manipulées dans des conditions limitant les risques de contamination sous hotte à flux laminaire.

1.2. Les cellules B de LLC

1.2.a. Patients et prélèvements

Des patients âgés de 41 à 84 ans (moyenne d'âge de 64,7 ± 0,3 ans) ont été inclus dans ce projet. Ils étaient tous suivis en consultation par le professeur Pierre Feugier dans le service d'Hématologie Adulte (Centre Hospitalier de Nancy). Tous les patients ont été informés oralement de l'étude et leur consentement éclairé écrit et signé a été recueilli. Leur participation à ce travail avait été approuvée par le Comité Local d'Ethique de Nancy. Les prélèvements, constitués de 2 tubes de 6 ml de sang total prélevé sur EDTA, ont été réalisés

dans le cadre habituel des bilans sanguins nécessaires pour l'exploration et le suivi des LLC-B.

1.2.b. Isolement des lymphocytes B de LLC

L'isolement des cellules B à partir de sang total du patient de LLC, a été réalisé par isolation négative en utilisant la technique des **Rosettes ou TAC** (Tetrameric Antibody Complexe) (RosetteSep Human B Cell Enrichement Cocktail, StemCell Technologies)**.** Cette technique consiste à éliminer toutes les cellules non B à l'aide d'un cocktail d'anticorps dirigés contre les cellules hématopoïétique humaines non B : anticorps anti-CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b ainsi que la glycophorin A des globules rouges.

Cinquante µL de RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail ont été ajouté à 1 ml du sang total, puis incubés, sous rotation, pendant 20 minutes à température ambiante. Après dilution du volume totale avec un volume égale du PBS, les cellules B non fixées par les rosettes ont été centrifugées sur gradient de **Ficoll-Hypaque.** Finalement une étude de pureté a été réalisée par cytométrie de flux.

1.2.c. Traitement et culture des lymphocytes B de LLC

Afin d'étudier l'effet de l'IL-24 sur les lymphocytes B de LLC, ces cellules purifiées (96-98%) ont été stimulées par IL-2 recombinant (100 ng/ml) pendant 24 heures puis cultivées avec ou sans r-IL-24 (100 ng/ml). Au troisième jour (72 heures), les cellules B stimulées ont été analysées par cytométrie de flux, PCR, qPCR et WesternBlot.

Comme dans le modèle des lymphocytes B normaux, ces cellules ont été cultivées dans un milieu de culture complet RPMI, contenant les nutriments et les facteurs de croissance nécessaire à leur survie et dans des conditions optimales (atmosphère humide, enrichie en CO_2 5%, et à 37°C) en présence d'agent de stimulation. Ces cellules ont été manipulées dans des conditions limitant les risques de contamination sous hotte à flux laminaire.

2 Deuxième partie : Exploration phénotypique et fonctionnelle par cytométrie en flux

2.1. Cytométrie en flux

Cette technique permet une analyse quantitative et qualitative précise de cellules marquées de manière directe ou indirecte par des anticorps conjugués à un ou plusieurs fluorochromes.

L'analyse est réalisée dans un système fluidique très fin sous pression. Les cellules en suspension sont guidées dans un fin capillaire de liquide de gaine, où elles vont, l'une après l'autre, traverser le faisceau d'un laser émettant une lumière cohérente à une longueur d'onde spécifique permettant d'exciter le ou les fluorochromes présents sur/dans chaque cellule. Les fluorochromes ainsi excités émettent un signal lumineux dans une longueur d'onde spécifique de chacun d'eux.

Les signaux optiques émis par chaque cellule sont focalisés et séparés par des circuits de miroirs dichroïques puis acheminés vers les systèmes de détection qui sont des photomultiplicateurs permettant de convertir les signaux optiques en signaux électriques. Des filtres optiques sont placés avant ces détecteurs et permettent de séparer dans le rayonnement émis les différentes longueurs d'onde de façon à ce que seule la longueur d'onde correspondant à l'émission d'un fluorochrome spécifique soit recueillie par chaque détecteur : par exemple, comme l'isothiocyanate de fluorescéine émet dans le vert, un filtre absorbant à 525 nm est utilisé (figure 24)

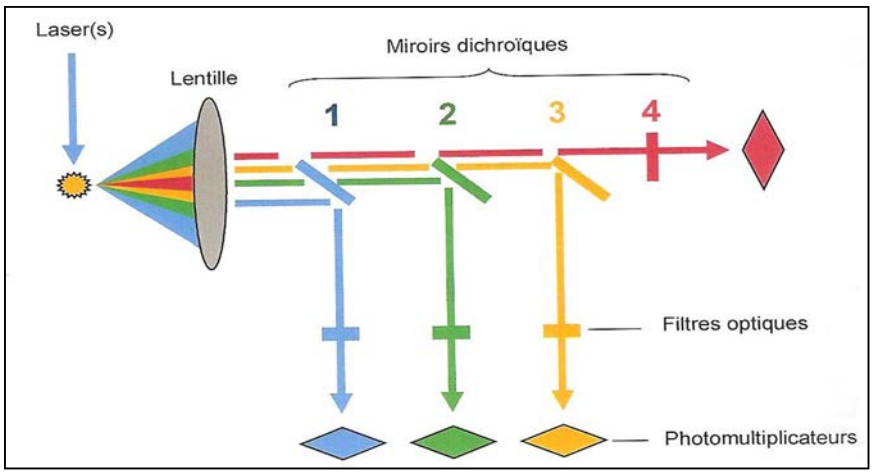


Figure 24 : Représentation schématique du système de la fluorescence du cytométrie en flux (adaptédehttp://www.cardiff.ac.uk/medic/aboutus/departements/hematology/resources/biomed04.ppt#306,11,Diapositive 11)

Chacun des fluorochromes va donc émettre une fluorescence qui sera séparée et transformée en signal électrique. Son intensité, exprimée par un numéro de canal, sera convertie en valeurs numériques qui seront analysées sur un ordinateur : on visualisera les résultats sur un écran par des histogrammes.

Hormis la fluorescence, d'autres propriétés de la cellule sont analysées. La lumière diffractée selon le même axe que la lumière du laser est détectée dans le canal "**Forward Scatter**"(FS). Cette valeur est proportionnelle à la taille de la cellule analysée et peut donc permettre de

distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Les signaux indésirables tels que les débris cellulaires peuvent ainsi être exclus de l'analyse. La lumière diffractée selon un axe perpendiculaire au trajet de la lumière du laser est quant à elle détectée dans le canal "**Side Scatter**"(SS) et témoigne du contenu de la cellule ou la granulosité (figure 25).

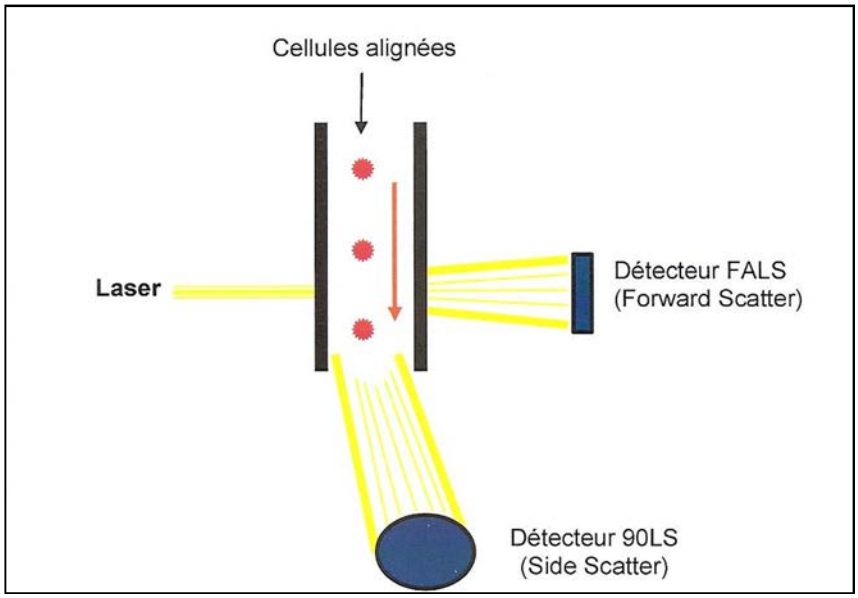


Figure 25 : Principe De détection du « Forward Scatter » (FS) et du « Side Scatter » (SS) (adapté de http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/theory/fluiopti/sld035.htm)

Ce signal dépend ainsi du rapport nucléocytoplasmique, des granulations cytoplasmiques et de la réfringence de la cellule. Ce paramètre analyse la diffraction du laser liée aux organites intracellulaires. Il reflète l'aspect plus ou moins granuleux du cytoplasme des cellules.

L'affichage simultané des paramètres FS, SS traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur l'écran sous forme de point. C'est le cytogramme, nuage de signaux punctiformes, qui apparait. La formation d'un nuage de points plus dense permet de placer une fenêtre d'intérêt englobant la population cellulaire à étudier.

Pour une même cellule, plusieurs paramètres de morphologie et de fluorescence sont enregistrés simultanément. L'analyse peut donc se faire selon un paramètre donné (analyse monoparamètrique) ou en associant deux ou plusieurs paramètres (analyse multiparamétrique) accompagnés pour chacun d'une liste des statistiques afférentes. Cette dernière peut contenir pour chaque sous population cellulaire sélectionnée le nombre de cellules, le pourcentage par rapport au total ou à un fenêtrage spécifique, la valeur moyenne des paramètres analysés, le pic de fluorescence ou encore les coefficients de variation.

2.2. Etude immunophénotypique des lymphocytes B normaux et ceux de LLC

La pureté des cellules B après isolation négative a été évaluée par une analyse immunophénotypique en cytométrie en flux en utilisant deux anticorps monoclonaux : anti-CD19 couplé à la phycoérythrine-cyanine 7(PC7) et anti-CD5 couplé à la phycoérythrine (PE).

Cinquante µl de cellules (10^6 cellules) en suspension, avant et après isolation des cellules B, ont été incubées 20 minutes à 4°C et à l'obscurité avec 5µl d'anticorps anti- CD19 PC7 et 5µl d'anti-CD5 PE. Un lavage a été réalisé en PBS et 500 µl de paraformaldéhyde ont été ajoutées dans chaque échantillon qui a été conservé à 4°C à l'obscurité jusqu'à analyse en cytométrie de flux (le jour même).

Des contrôles isotypiques ont été réalisés, de façon à déterminer le seuil de positivité du marquage, l'intensité de fluorescence de base pour chaque fluorochrome et à calculer les intensités moyennes de fluorescences (MFI) relatives et les Médianes.

2.3. Etude de l'expression d'IGF1-R

Dans le but d'étudier l'expression du récepteur à l'IGF1 par les lymphocytes B normaux et leucémiques, ces cellules ont été stimulées sous différentes conditions (CD40L; anti-IgM ; CpG ODN et SDF1) pendant 48 heures. A j3, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 400g à 4°C. Le culot est lavé dans 5 ml de PBS 1X froid et centrifugé à nouveau. Le culot est repris dans 50 µl du PBS 1X+ 0,1% BSA auxquels sont ajoutés 5 µl d'anticorps anti-IGF1-R FITC. Apres incubation 20 min à 4°C et à l'obscurité, les cellules sont lavées avec 5 ml du PBS 1X et centrifugées à nouveau. Le surnageant est éliminé et les cellules sont fixées par 500 µl de paraformaldéhyde (PFA) 1%. Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (FC500, Beckman-Coulter). L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel XP (Beckman-Coulter).

2.4. Etude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire

Les cellules B stimulées avec le cocktail de cytokines puis stimulées ou non avec l'IL-24 et l'IGF1 sont centrifugées et lavées comme décrit plus haut. Le culot est ainsi repris dans 50 µl de la solution de DNA PREP LPR (solution de perméabilisation et de fixation des noyaux des

cellules), vortexé rapidement et incubé avec 500 µl de la solution de DNA PREP Stain (contenant de IP 50 µg/ml, RNAse de type III-A 4 KU/ml) pendant une heure à température ambiante. Puis les échantillons sont analysés par cytométrie en flux selon un histogramme monoparamétrique en FL3-Lin.

Lorsque le cycle cellulaire est analysé, il est nécessaire de ne pas prendre en compte les doublets de cellules. En effet, si deux cellules passent simultanément dans la chambre de mesure du cytomètre, celui-ci détecte un seul événement, dont la fluorescence correspond à la somme des fluorescences de chacune des cellules. Pa exemple, si deux cellules en phases G_1 passent simultanément dans la chambre de mesure, le cytomètre détecte un événement possédant une fluorescence équivalente à la celle d'une cellule en phase G_2. De plus, les événements contenus dans le pic sub-G_1 sont des débris cellulaires, comme des cellules en fin d'apoptose ou des cellules en nécrose. Elles ne sont pas prises en compte dans l'analyse du cycle cellulaire pour ne pas fausser la proportion de cellules en cycle. C'est pourquoi il est question de « nombre d'événement » et non pas de «nombre de cellules ». Lorsqu'une cellule est marquée par l'IP, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN et permet de déterminer la phase du cycle dans laquelle elle se trouve.

2.5. Etude des caractéristiques de l'apoptose

2.5.a. Détection des Phosphatidyl Sérines par l'Annexine V

Dans une cellule non-apoptotique les phosphatidylsérines membranaires ne sont situées que sur la face interne de la membrane. Dés qu'une cellule entre en apoptose, sa membrane cytoplasmique est altéré et les phosphatidylsérines sont délocalisées et exprimées des deux cotés de la membrane. L'annexine V ayant une forte affinité pour ces molécules va donc marquer les cellules apoptotiques. Il faut noter que les cellules mortes seront aussi marquées par l'annexine. Toutefois, il est possible de discriminer par double marquage les cellules apoptotiques des cellules mortes (nécrotiques) en rajoutant de l'IP lors du marquage qui ne pénètrera que dans les cellules mortes et les cellules en apoptose tardive. Les cellules apoptotiques mais pas mortes seront Ann+IP- et les cellules mortes seront Ann^+IP^+.

Les cellules en culture (10^6 cellules/ml) sont centrifugées 5 minutes à 400 g à 20°C puis lavée avec 5 ml du PBS 1X et centrifugées à nouveau. Le culot est traité avec un kit de détection d'apoptose (kit Annexine V-FITC, BD). 10^5 cellules contenues dans 100 µl de solution Binding Buffer 1X froid sont incubées avec 5 µl d'annexine V-FITC et 5 µl d'iodure de

propidium (IP) à l'obscurité pendant 15 minutes et à température ambiante. Après, 400 µl de solution Binding Buffer 1X est ajouté avant analyse au FACS.

2.5.b. La dépolarisation des membranes mitochondriales

Les changements de polarisation de la membrane mitochondriale sont évalués en utilisant le NIR Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (abcam). Le NIR Dye est un colorant cationique lipophile qui s'accumule dans les mitochondries polarisées. Dans les cellules normales, l'intensité de la fluorescence rouge est augmentée quand le NIR Dye s'accumule dans la mitochondrie. Par contre, dans les cellules apoptotiques, l'intensité est diminuée après l'effondrement du potentiel membranaire mitochondrial. Les cellules incubées avec le NIR ont été visualisé avec un cytométre en flux à une excitation et une émission rouge (canal FL4).

Les cellules (10^6/ml) traitées ou non avec l'IL-24 sont collectées comme précédemment et lavées dans 5 ml de PBS. Le culot est repris dan 1 ml de PBS auquel est ajouté 5 µl de NIR Dye. Les cellules sont ensuite incubées entre 15 à 30 minutes à 37°C dans le noir. Les échantillons sont centrifugés et les culots sont lavés dans 5 ml de PBS avant d'être à nouveau centrifugés et analysés en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules hautement marquées par le NIR est déterminé.

2.5.c. La diminution de nombre de mitochondries dans les cellules apoptotiques.

La diminution de nombre de mitochondries est évaluée en utilisant des sondes sélectives de mitochondries, MitoTracker®Orange CMTMRos (Invitrogen). Ces sondes ont une fluorescence orange et marquent les mitochondries dans les cellules vivantes. Leur accumulation dépend du potentiel membranaire mitochondrial. Après leur pénétration passive dans la cellule vivante, ces sondes sont séquestrées dans les mitochondries où elles réagissent avec des thiols de protéines et de peptides pour former un conjugué aldéhydique qui conserve la fluorescence des ces sondes. L'analyse est réalisée sur un cytométre en flux (Beckman Coulter, FC500) à une excitation de 554 nm de longueur d'ondes et une émission de 576 nm (canal FL2).

Le MitoTracker®Orange CMTMRos est solubilisé dans du DMSO de haute qualité pour réaliser une solution stock de 50 µM qui est diluée extemporanément dans du milieu complet. Les cellules (10^6/ml) traitées ou non avec l'IL-24 sont collectées comme précédemment et lavées dans 5 ml de PBS. Le culot est repris dan 1 ml de PBS auquel est ajouté le

MitoTracker®Orange CMTMRos (25-500 nM). Les cellules sont ensuite incubées entre 15 à 30 minutes à 37°C dans le noir. Les échantillons sont centrifugés et les culots sont lavés dans 5 ml de PBS avant d'être à nouveau centrifugés et analysés en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules hautement marquées par le MitoTracker®Orange CMTMRos est déterminé.

3 Troisième partie : Etude de l'expression des ARN messagers

3.1. Extraction des ARN totaux

Suivant la disponibilité des trousses, deux techniques distinctes ont été utilisées :

3.1.a. Extraction au Trizol

Aux temps indiqués, les cellules en culture sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes et la lavées avec du PBS. Le culot est conservé à -80°C avant extraction d'ARN. Le jour de l'extraction, les cellules sont lysées en ajoutant 500 µl de Trizol (Invitrogene) pendant 5 minutes à température ambiante. Les ARN sont extraits en ajoutant 100 µl de chloroforme (CARLOERBA, France). La solution est agitée vigoureusement par inversion pendant 15 secondes puis incuber 2 minutes à température ambiante. Ensuite les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12000 g à 4°C. La phase aqueuse, d'environ 400 à 600 µl (pour 1 ml de Trizol initial) est prélevée et les ARN sont précipités avec 500 µl d'isopropanol froid, vortexés puis incubés à -20°C toute la nuit. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 12000 g puis lavés avec 75% d'éthanol en H_2O DEPC (1 ml Ethanol pour 1 ml de Trizol) et centrifugés 5 minutes à 7500 g. Le surnageant est enlevé par inversion et le culot est séché à température ambiante. Les culots d'ARN sont enfin repris dans 30 à 60 µl d'H_2O DEPC ou H_2O ultra pure avant d'être dosés par la mesure de l'absorbance à 260 nm (sur un Nanodrop). Après dosage, les échantillons sont conservés à -80°C.

3.1.b. Extraction sur colonne (RNeasy Mini Kit – Qiagen)

Les cellules en culture sont centrifugées comme indiqué en haut. Le culot sec est conservé à –80°C jusqu'au jour d'extraction d'ARN ou bien homogénéisé dans 350 µl de la solution RTL+ β-ME (Tampon de Lyse) et vortexé vigoureusement pendant 1 minute. Les ARN sont purifiés en rajoutant un volume égal de 70% d'éthanol en H_2O DEPC. 700 µl du mélange est transféré sur une colonne RNeasy. Centrifugé 15 secondes à 11000 g à température ambiante. Une digestion de l'ADN contaminant est réalisée sur colonne en ajoutant 80 µl de la solution

de DNase (10 µl de DNase+ 70 µl de RDD) et incubant 15 minutes à température ambiante.700 µl de de la solution RW1 (pour arrêter l'action de DNase) est ajouté sur la colonne puis centrifugés 15 secondes à 11000 g à température ambiante. Les ARN fixés sur la colonne sont lavés deux fois avec 500 µl de la solution RPE puis centrifugés 15 secondes à 11000g pendant le premier lavage et 2 minutes à 11000 g pendant le deuxième lavage. Enfin, la colonne est placée sur un tube de 1,5 ml (RNase free) et 40 µl de H_2O RNase-free est ajouté au centre de la colonne puis centrifugée 2 minutes à vitesse maximale (16000g) à 4°C. Les ARN totaux sont ensuite dosés par la mesure de l'absorbance à 260 nm (sur un Nanodrop). Après dosage, les échantillons sont conservés à -80°C.

3.2. Préparation des échantillons

La concentration en ARN totaux est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260, sachant qu'une unité d'absorbance correspond à une concentration de 40 µg d'ARN par ml. Les échantillons sont aliquotés de deux manières : 5 µg d'ARN sont précipités en présence de 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,5 et de 2 volume d'éthanol absolu, 300 ou 500 ng sont utilisés pour la transcription réverse.

La qualité des ARN est contrôlée en réalisant une électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (TAE 1X) des échantillons de 500 ng d'ARN totaux.

3.3. Etude de l'expression des ARN messagers par la technique des Biopuces

Les puces "**Agilent 60-mer Whole Human Genome**", imprimées avec la technologie "**Agilent SurePrint®** ", sont utilisées dans notre travail. Ces puces ont 41000 gènes et transcrits humains avec une sonde d'oligonucléotide de 60-mer représentant chaque séquence. De plus, 75 sondes sélectées sont répliquées 10 fois pour permettre les mesures de reproductibilité intra-puces. Des sondes désignant 10 transcrits mRNA différents d'un contrôle interne, "Spike-in", sont répliquées 30 fois dans ces puces. Chaque puce est formée de quatre chambres de 44k chaqu'une (41000 sondes pour les transcrits et 3000 pour le ″Spike-in″).

La technique fait appel à une hybridation ADN-ARN. Mais ici, et contrairement à d'autres biopuces (type AFFymétrix), on hybride directement avec les cRNA extraits des cellules. Ces cRNA sont produits par transcription inverse des mRNA en cDNA simple brin. Dans un

second temps, les cDNA sont amplifiés en cRNA. Durant cette étape, ces derniers sont marqués avec le fluorochrome cy3 puis hybridés sur la puce. Après lavage et acquisition de l'image d'hybridation, le signal fixé sur chaque cible est détecté, quantifié et enregistré de façon automatique grâce à des logiciels d'analyse. Ce signal reflète la concentration de la séquence correspondante dans la sonde, donc le niveau d'expression du gène concerné. Les intensités obtenues sont ensuite normalisées par rapport à un contrôle interne d'ARN, "**Spike-In**", qui possède des sondes fixées sur la puce. Ceci permet de dresser, pour chaque échantillon, un véritable portrait moléculaire qui pourrait alors être comparé à celui d'autres échantillons.

3.4. RT-PCR semi quantitative et PCR en temps réel (qPCR)

3.4.a. Transcription inverse (RT)

Cette technique permet d'obtenir, à partir d'un ARN, le brin d'ADN complémentaire (ADNc). Dans toutes nos PCR et PCR en temps réel, nous avons utilisés entre 300 et 500 ng d'ARN totaux. Après une digestion à la DNase, les ART totaux (8 µl), 1 µl d'amorce oligo (dT_{20}) à 10 µM (1,5 µM final), 1 µl de dNTPs Mix à 10 mM, à une concentration de 0,5 mM chacun, 4 µl de tampon de l'enzyme 5X (fisrt strand buffer), 2 µl de DTT à 0,1 M (10 mM final) ainsi que 1 µl (soit 200 U) de transcriptase réverse SuperScript II RT (Invitrogen) sont incubés 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C afin d'inactiver la transcriptase réverse. Dans la mesure du possible, les échantillons sont utilisés en PCR tout de suite après.

3.4.b. PCR semi quantitative

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Pour avoir réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes. (1) Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ; (2) borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ; (3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

La PCR semi quantitative est réalisée avec un kit de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Les amorces utilisées sont dessinées à l'aide du logiciel

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi). Ces amorces sont utilisées pour amplifier des fragments de 260 à 800 pb (tableaux 4 et 5). La normalisation est effectuée avec le niveau de transcrit *β- Actine*.

Nom	Séquence	Tm	Longueur
POLE2 F	GGGCGCTCTCCGCCTTCAAG	57°C	20 nucléotides
POLE2 R	GCCTGTGGGTCCTCTGGTGC	57°C	20 nucléotides
FEN1 F	GCGGCTGAACGTCAGGCCAC	69°C	20 nucléotides
FEN1 R	CTTGAGCTGTGGCGGCT0TGC	69°C	20 nucléotides
PHB F	TGTGGTTGGGGAATTCATGTGGAGG	58°C	25 nucléotides
PHB R	ATGAGCCCAAAGGTGGCGGC	58°C	20 nucléotides
CDC45L F	GTGTGACACCCATAGGCCAGTCAAT	60°C	25 nucléotides
CDC45L R	CCGGGAGACTTCTCAGGGGATT	60°C	23 nucléotides
CDC6 F	GCACTGGATGTTTGCAGGAGAGCT	60°C	24 nucléotides
CDC6 R	CCGCCACCTGCTGTTTGCGA	60°C	20 nucléotides
MCM10 F	AATGGCGAGCCCGACGCATT	58°C	20 nucléotides
MCM10 R	CCGGGGAGACTTCTCAGGGGATT	58°C	23 nucléotides
IGF1 F	GACCCTTTGCGGGGCTGAGCTGGT	59°C	24 nucléotides
IGF1 R	CTTCTGAGTCTTGGGCATGTCAGT	59°C	24 nucléotides
IL-24 F	ACGGCTGGGACGGGAACCTT	57°C	20 nucléotides
IL-24 R	GCCCTGGGCCCCTGATACCT	57°C	20 nucléotides
β-Actin F	CTACAATGAGCTGCGTGTGGC	58°C	21 nucléotides
β-Actin R	CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	58°C	21 nucléotides

Tableau 4 : Amorces des gènes de la voie de réplication d'ADN et de l'IL-24 utilisées pour la PCR semi quantitative.

Nom	Séquence	Tm	Longueur
CASP8 F	GGTGGAGCGGATTATATTCTCC	58°C	22 nucléotides
CASP8 R	CCAGCAGGTTCATGTCATCATC	58°C	22 nucléotides
BID F	AGGCCATGGACTGTGAGGTCAACA	54°C	24 nucléotides
BID R	CCATCCCATTTCTGGCTAAGCTCC	54°C	24 nucléotides
BAXF	CAGGGTTTCATCCAGGATCGAGC	60°C	23 nucléotides
BAX R	CACCACTGTGACCTGCTCCAGAA	60°C	23 nucléotides
COX6C F	TAAGAAGATAAAGAGGTCGATAA	62°C	23 nucléotides
COX6C R	CCTGAAGAAATTCTTTATATTCC	62°C	23 nucléotides
COX7B F	AATCGTCTCCAAGTTCGAAGCAT	50°C	23 nucléotides
COX7B R	GCCATATCTTAATGGGTACACAG	50°C	23 nucléotides

Tableau 5 : Amorces des gènes de la voie d'apoptose utilisées pour la PCR semi quantitative.

Pour un volume final de 25 µl, le mélange réactionnel est composé de : 2,5 µl de 10X PCR Buffer (1X final), 0,5 µl de 10 mM d NTP Mix (0,2 mM final chaqu'un), entre 0,75 et 1,25 µl

de 50 mM $MgCl_2$ (selon les amorces), 0,5 µl de chaque amorce spécifique (10 µM) (0,2 µM final), 1 µl d'ADNc totaux, 0,1 µl de l'enzyme Platinum® *Taq* DNA Polymerase (1 U final). Le mélange est complété avec H_2O-DEPC jusqu'à 25 µl.

Le programme d'amplification est le suivant :

• **Dénaturation initiale (et activation de l'enzyme)**	**95°C**	**5 minutes**	
• **Amplification en trois étapes (dénaturation+ hybridation+elongation)**	**95°C** **Tm** **72°C**	**30 secondes** **45 secondes** **1 minute**	**27-35 cycles**
• **Elongation finale**	**72°C**	**7 minutes**	

La réaction d'amplification est réalisée dans un thermocycler programmé (MasterCycler gradient, Eppendorf). Le niveau d'expression des gènes cibles est analysé en réalisant une électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (TAE 1X), mélangé avec du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µM. le BET est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. La visualisation des bandes d'ADN marqués avec le BET est faite dans un Gel Doc (BioRad) sous rayonnement UV et les images sont analysées avec le logiciel Quantity One.

3.4.c. PCR quantitative ou en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est réalisée pas la méthode de SsoFast™ EvaGreen (BioRad). Le mélange SsoFast™ EvaGreen Supermix contient une ADN polymérase couplée avec une protéine, Sso7d, qui se fixe sur l'ADN double brin, permettant de stabiliser l'activité de l'enzyme. Les amorces ont été dessinées sur le site de CenScript (https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer). Ces amorces sont utilisées pour amplifier des fragments de 50 à 250 pb (Tableaux 6, 7 et 8, pages suivantes). La normalisation est effectuée avec le niveau de transcrit β-actine et GAPDH.

Le mélange réactionnel (15 µl en volume final) est composé de 7,5µl de SsoFast™ EvaGreen Supermix, 0,4 µl de chaque amorce spécifique à 10 µM (final de 0,25 µM), 1 µl d'ADNc (à partir de 300 ng d'ARN) et 5,7 µl d'eau ultra-pure

Nom	Séquence	Tm	Longueur
POLE2 F	TACTCCTCCGGTGATAGGTTCT	49°C	22 nucléotides
POLE2 R	CTGGAATTTGCTTCCGCTTTC	49°C	21 nucléotides
FEN1 F	GTATTGGGCAACCTCATTCCC	52°C	21 nucléotides
FEN1 R	CCTTGCGTTCCTTCATGTAGT	52°C	21 nucléotides
CDC45 F	CTTGAAGTTCCCGCCTATGAAG	52°C	22 nucléotides
CDC45 R	GCATGGTTTGCTCCACTATCTC	52°C	22 nucléotides
CDC6 F	CCAGGCACAGGCTACAATCAG	49°C	21 nucléotides
CDC6 R	AACAGGTTACGGTTTGGACATT	49°C	22 nucléotides
MCM10 F	CAACCCCTACAGACGATTTCTC	50°C	22 nucléotides
MCM10 R	GGGTCCCCACAATTTGACCTC	50°C	21 nucléotides
IGF1 F	GGAGCTGTGATCTAAGGAGGC	53°C	20 nucléotides
IGF1 R	GGACAGAGCGAGCTGACTT	53°C	19 nucléotides
b-Actine F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	55°C	21 nucléotides
b-Actine R	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	55°C	21 nucléotides
GAPDH F	CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT	60°C	20 nucléotides
GAPDH R	CCATGGTGTCTGAGCGATGT	60°C	20 nucléotides

Tableau 6 : Amorces des gènes de la voie de réplication d'ADN utilisées pour la q-PCR.

Nom	Séquence	Tm	Longueur
IL24 F1	GTC ACA ACT GCA ACC CAG TC	60°C	20 nucléotides
IL24 R1	CGT CCA ACT GTT TGA ATG CT	60°C	20 nucléotides
IL24 F2	CAA CTG CAA CCC AGT CAA GAA A	62°C	22 nucléotides
IL24 R2	TGC TCT CCG GAA TAG CAG AAA	62°C	21 nucléotides
IL24 F3	ATG CAA CAC CAC ATC AGG AT	59°C	20 nucléotides
IL24 R3	CAA CCG CTT GTC TTC ACA GA	59°C	20 nucléotides
IL24 F4	ACG GCT GGG ACG GGA ACC TT	60°C	20 nucléotides
IL24 R4	GCC CTG GGC CCC TGA TAC CT	60°C	20 nucléotides
IL24 F5	TTT CAA CAG AGG CTG CAA AGC	56°C	21 nucléotides
IL24 R5	GCA CAA CCA TCT GCA TTT GAG A	56°C	22 nucléotides
IL24 F6	TAG CGG CCG CAT GAA TTT TCA ACA GAG G	58°C	28 nucléotides
IL24 R6	TAG CGG CCG CTC ACA GCT TGT AGA ATT T	58°C	28 nucléotides
IL24 F7	CAG ACC CTT CTG CCC TCC TTT G	61°C	22 nucléotides
IL24 F7	CAA GGG CTT TGG TCA GAG CTG C	61°C	22 nucléotides

Tableau 7 : Amorces du gène de l'IL-24 utilisées pour la q-PCR. Parmi les 7 couples d'amorces testés, une seule couple a fonctionné (couple 7), les autres couples ont donné des résultats non spécifiques.

Le programme d'amplification est le suivant :

• **Dénaturation initiale (et activation de l'enzyme)**	**95°C**	**2 minutes**	
• **Amplification en deux étapes (dénaturation, hybridation+elongation)**	**95°C** **Tm**	**15 secondes** **45 secondes**	**35-40 cycles**
• **Courbe de fusion (Melting Curve) (20 minutes)**	**95°C** **Tm** **95°C**	**15 secondes** **15 secondes** **15 secondes**	

Nom	Séquence	Tm	Longueur
CASP8 F	TTTCTGCCTACAGGTTCCACT	48°C	21 nucléotides
CASP8 R	CCTCAATTCTGATCTGCTCACTT	48°C	23 nucléotides
BID F	CCTTGCTCCGTGATGTCTTTC	53°C	21 nucléotides
BID R	GTAGGTGCGTAGGTTCTGGT	53°C	20 nucléotides
BAXF	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	52°C	21 nucléotides
BAX R	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	53°C	21 nucléotides
COX6C F	CCAAAACCTCGGATGCGTG	56°C	19 nucléotides
COX6C R	AAATCTGCGTATGCCTTCTTTCT	560C	23 nucléotides
COX7B F	CTTGGTCAAAAGCGCACTAAATC	57°C	23 nucléotides
COX7B R	AAAATCAGGTGTACGTTTCTGGT	57°C	23 nucléotides

Tableau 8 : Amorces des gènes de la voie d'apoptose utilisées pour la q-PCR.

Analyse : l'appareil de PCR en temps réel « Realplex^2 » (Eppendorf) est un thermocycler rapide (à air pulsé), couplé à un microspectrofluorimètre. Il est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données. L'EvaGreen est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin et devient alors fluorescent. Contrairement au Syber Green I, l'EvaGreen présente une très faible inhibition de la PCR, ce qui en fait un choix idéal pour les protocoles de qPCR rapides.

Pendant la réaction de polymérisation et à chaque cycle d'amplification, l'EvaGreen se lie à l'ADN nouvellement synthétisé. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation et augmente donc à chaque cycle d'amplification. Le tracé de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles représente une courbe sigmoïde (figure 26, page suivante). Au cours de la phase exponentielle, la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée et permet de quantifier la quantité d'ADNc initiale et donc celle du messager d'intérêt. Le cycle de PCR significatif est celui où le signal sort du bruit de fond, appelé Ct (pour cycle threshold), déterminé par l'appareil.

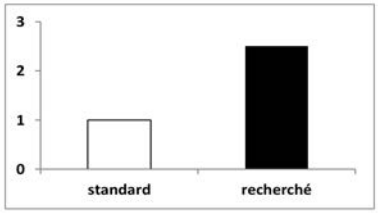
Pour nos expériences, nous avons choisi une quantification relative selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Des PCR effectuées en utilisant différentes dilutions d'ADNc (1/1, 1/10, 1/100) permettant d'obtenir la pente (slope) de la courbe Ct=f(log(concentration)) donnée par l'appareil (figure). La formule $E=10^{(-1/pente)}$ permet de calculer l'efficacité E de la PCR pour chaque gène étudié. Le *ratio* du taux de messagers du gène d'intérêt « traité » par rapport au « contrôle » et normalisé par rapport au gène de référence se calcule selon la formule suivante (page suivante):

	Gène de normalisation	gène d'intérêt
Standard	Ct_1	Ct_2
Recherché	Ct_a	Ct_b

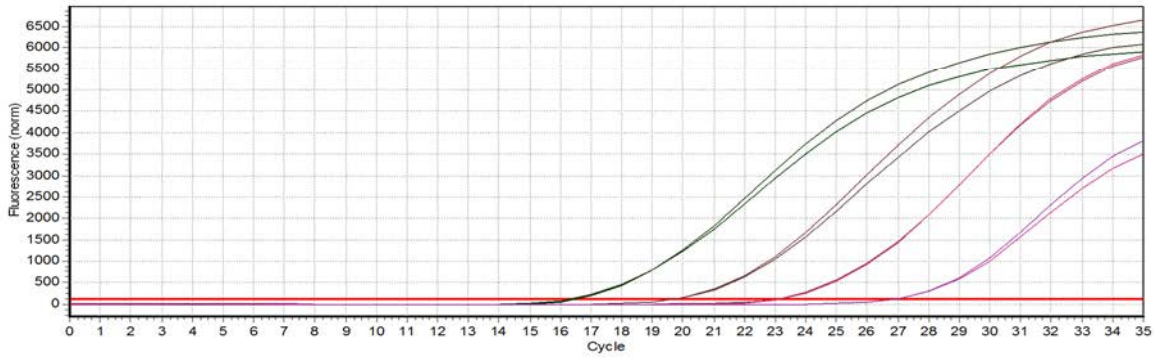
$$\Delta Ct_{\text{gène de normalisation, standard}} = Ct_1 - Ct_1 = 0$$
$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt, standard}} = Ct_2 - Ct_2 = 0$$
$$\Delta Ct_{\text{gène de normalisation, rechercé}} = Ct_1 - Ct_a$$
$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt, rechercé}} = Ct_2 - Ct_b$$

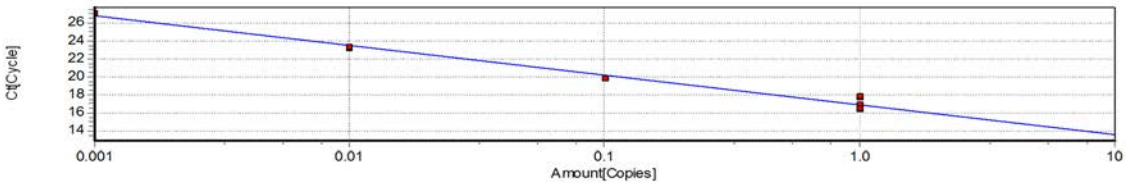
$$Ratio_{\text{standard}} = \frac{(E_{\text{gène d'intérêt}})^{(Ct_2 - Ct_2)}}{(E_{\text{gène de normalisation}})^{(Ct_1 - Ct_1)}} = 1$$

$$Ratio_{\text{recherché}} = \frac{(E_{\text{gène d'intérêt}})^{(Ct_2 - Ct_b)}}{(E_{\text{gène de normalisation}})^{(Ct_1 - Ct_a)}}$$



Pos	Name	Ct	Copies
C1	0 il24 1/1	16,49	1
C3	0 il24 1/10	19,85	0,1
C5	0 il24 1/100	23,22	1,00E-02
C7	0 il24 1/1000	26,99	1,00E-03





Slope: -3.267
Y-Intercept: 16.92
Efficiency: 1.02
R^2: 0.986

Figure 26 : Détermination du Ct et de l'efficacité. La fluorescence est mesurée à chaque cycle d'amplification. La courbe, représentant la fluorescence (F1) en fonction du nombre de cycles, dessine une sigmoïde (en haut). Le logiciel du Realplex[2] calcule le cycle à partir duquel la fluorescence sort du bruit de fond (Ct). A partir d'une gamme de dilution, le logiciel détermine la pente (Slope) de la droite représentant le nombre de cycles en fonction du logarithme de la concentration (en bas). Cette étape permet de calculer l'efficacité de la PCR pour chacun des couples d'amorces.

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (Tf) spécifique, définie comme étant la température à laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50% sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée jusqu'à la température d'hybridation des amorces, ce qui provoque l'hybridation de la totalité des brins d'ADN. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est mesurée en continu pendant cette remontée de la température. Lorsque la température atteint la température de fusion, les brins se dissocient, ce qui se traduit par une courbe sigmoïde (figure 27). La dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température est calculée par le logiciel et permet de déterminer la température de fusion du brin d'ADN polymérisé, qui correspond à la température atteinte au maximum du pic (figure 27).

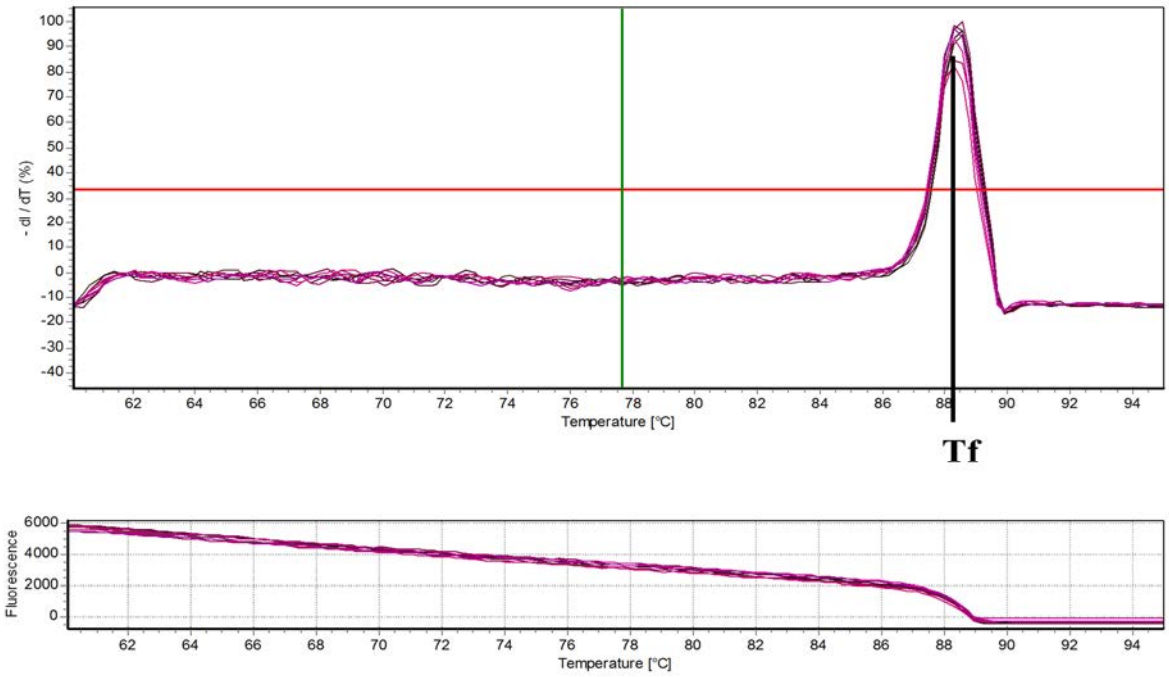


Figure 27 : Détermination de la température de fusion. Après la déshybridation (95°C) puis l'hybridation (60°C) de la totalité des brins d'ADN, la température augmente lentement de 60°C à 95°C. Pendant cette élévation de température, la fluorescence, mesurée en continu, diminue progressivement et lentement (en bas). Lorsque la température atteint la température de fusion des fragments amplifiés, ils se déshybrident massivement, sur la totalité de leur longueur. Le logiciel du Realplex^2 calcule le pourcentage de la dérivée – d(I)/dT, avec I= intensité de fluorescence (en haut). La courbe obtenue montre un pic dont le maximum correspond à la température de fusion du brin amplifié (Tf). Le fait de n'avoir qu'un seul pic permet de s'assurer de la présence d'un seul produit d'amplification. Le tracé de couleur rose rectiligne représente le pourcentage d'un seuil (Threshold) donné automatiquement par la machine (33%). Il est obtenu dans le contrôle négatif contenant le mélange des réactifs de la PCR sans ADNc (blanc).

Analyses statistiques : les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le « Student Test » sur le logiciel Windows Excel.

4 Quatrième partie : Etude de l'expression des protéines (Western Blot)

4.1. Préparation des échantillons

4.1.a. Extraction des protéines

Les cellules (5.10^6/ml) en culture sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes puis lavées avec 5 ml du PBS (1X). Les culots secs sont ensuite stockés à -80°C, jusqu'au jour de l'extraction des protéines, ou bien repris directement avec 200 µl d'une solution contenant un tampon de lyse (préparé au labo) et un inhibiteur de protéase (Roche). Les échantillons sont incubés sur la glace en vortexant régulièrement pendant 30 minutes. Puis ils sont centrifugés pendant 30 minutes à 16000g et à 4°C. Les surnageants (contenant les protéines) sont finalement récupérés dans des nouveaux tubes de 0,5 ml et mis à -20°C en attendant le dosage des protéines.

4.1.b. Dosage des protéines (Méthode de Bradford ou Bleu de Coomassie)

Cette méthode est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminées aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. Ce changement est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon

Pour doser les protéines, une gamme d'étalon de BSA est préparée à partir d'une solution mère à 2 µg/µl. 30 µl de chaque concentration sont déposés dans une plaque de 96 puits à fond plat, puis mélangés avec 200 µl de réactif de Bradford (chaque dépôt se fait en duplicate). De la même façon, 3 µl d'extrait protéique sont dilués dans 27 µl d'H_2O ultra pure, mélangés avec 200 µl de réactif de Bradford puis déposés dans la plaque. Les densités optiques (DO) des puits sont ensuite mesurées dans un lecteur (Wallac, VICTOR^2). Les DO de la gamme d'étalon sont utilisées pour établir la droite de régression et déterminer

l'équation de la courbe : f(x)= ax+b ainsi que le coefficient R^2 qui doit être ≥ 0,9. La concentration des échantillons en protéines est mesurée selon cette formule :

$$C= \left[\frac{DO-b}{a} \times 10 \right] \mu g/\mu l$$

Les échantillons (30-40 μg de protéines) sont ensuite bouillis pendant 5 minutes dans une solution tampon (Laemmli 1X) contenant une substance tampon (Tris HCl), un colorant (bleu de Bromophénol), un composant sulfhydryl (β-mercaptoéthanol 1/20), un détergent anionique lipophile (SDS) et du glycérol pour augmenter la poussée d'Archimède. A la fin de l'ébullition, les échantillons sont incubés sur la glace en attendant la migration par électrophorèse (le plus souvent juste après).

4.1.c. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Cette méthode permet une séparation des protéines selon leur taille. Les protéines ne traversent le gel que dans une dimension (du haut vers le bas). Après ébullition, les échantillons sont déposés dans des puits constitués dans le gel. Un puits est réservé à un marqueur de taille (BioRad), une mixture de protéines possédant différents poids moléculaires (de10 KD à 250 KD). La migration est faite pendant 1h30 à 80 volts dans le « *stocking gel* » puis 100 volts dans le « *Runnig gel* ». Les protéines sont scindées par masse en bandes dans chaque couloir constitué sous les puits. Le pourcentage du gel en Acrylamide varie selon la taille des protéines d'intérêt (pour la plupart des nos protéines d'intérêt, un gel de 12% a été utilisé). La composition d'un tampon d'électrophorèse (*Running buffer*) pour western blot est d'1 volume de tampon TGS (Tris-glycine-SDS) (BioRad) concentré 10 fois dans 9 volumes d'eau distillée.

4.1.d. Transfert des protéines sur membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride) ou Dot Boltting

Pour que les protéines soient accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de PVDF. Avant d'être utilisée, la membrane est activée dans le méthanol 100% pendant 10 minutes. Puis elle est positionnée face-à-face avec le gel, et mise sur une cassette entre deux papiers filtre (papiers Wattman) et deux éponges. Le transfert est fait dans une cuve contenant un tampon de transfert à un ampérage constant de 300 mA pendant 1 heure. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel.

La composition pour un litre d'un tampon de transfert est de :

- 700 ml d'eau distillée
- 100 ml de tampon TG (Tris-glycine) concentré 10 fois
- 200 ml de méthanol

4.1.e. Blocage de la membrane

Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en plongeant la membrane dans une solution du lait sans matières grasses dilué à 5% dans de l'eau distillée, et en présence d'un détergent (Tween® 20) à 0,1 % pendant une heure à température ambiante.

4.1.f. Incubation avec des anticorps monoclonaux primaires

Après le blocage, une solution diluée d'anticorps primaire (comprise entre 0.5 et 5 µg/ml) est incubée avec la membrane sous agitation modérée. Les anticorps utilisés dans nos expériences (Tableau 9) sont dilués ou bien dans du lait dilué à 5% dans du 1X TBS, 0,1% Tween 20 (anti-CDC45, anti-FEN1, anti-BID, anti-PHB1) ou bien dans une solution de BSA diluée à 5% dans du 1X TBS, 0,1% Tween 20 (anti-Casp8 et anti-Bax). L'incubation est faite à une température de 4°C sur toute la nuit.

Anticorps	Espèce	Dilution	Compagnie
Anti-cdc45	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Anti-FEN1	Souris	1/500	Calbiochem
Anti-PHB1	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Anti-casp8	Souris	1/1000	Cell Signaling
Anti-Bax	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Anti-Bid	Lapin	1/1000	Cell Signaling

Tableau 9 : les anticorps monoclonaux utilisés en WesternBlot.

4.1.g. Incubation avec des anticorps polyclonaux secondaires

Après incubation primaire, la membrane est rincée dans du TBS-0,1%Tween 20 trois fois pendant 10 minutes. Puis incubée avec une solution diluée (1/1000 et 1/3000) d'anticorps secondaire pendant une heure à température ambiante. Les deux anticorps secondaires utilisés sont liés à la *peroxydase de raifort* (horseradish peroxidase) et utilisé en conjonction avec un agent luminescent. Deux anticorps secondaires-HRP ont été utilisés : chèvre anti-Mouse et chèvre anti-lapin.

4.1.h. Détection par chimiluminescence (ECL)

Après rinçage de la membrane, elle est incubée avec une solution de détection chimique (Millipore). Cette solution contient deux réactifs : réactif A et réactif B (1volume de A pour 2 volumes de B). Ces deux réactifs servent comme un substrat de la peroxydase liée à l'anticorps secondaire qui, une fois mit en contact, ils donnent une lumière détectable par une caméra CCD (*Charge-Coupled Device*).

RESULTATS

RESULTATS

1 Effets transcriptomiques de l'IL-24 sur les lymphocytes B

Dans un travail précédent, notre équipe a démontré que l'IL-24 recombinante bloque la différenciation des cellules B du centre germinatif en plasmocytes, en tuant surtout les précurseurs des cellules plasmatiques. Elle diminue également le pourcentage des cellules B $CD38^+$ (plasmocytes) ainsi que la production des IgG dans les surnageants (Maarof et al., 2010). Dans ce modèle, les cellules B du CG ont été stimulées avec un cocktail de cytokines (IL-2+IL-10) et CD40-ligand soluble pendant 3 jours, suivi d'une stimulation de 4 jours avec IL-2 et IL-10 pour induire la différenciation des cellules plasmocytaires. L'addition d'IL-24 à la culture au jour 4 conduit à l'inhibition des pics G0/G1 et G2/M et l'augmentation du nombre de cellules hypodiploïdes ou mortes. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire induite par IL-24, nous avons analysé le profil transcriptomique des cellules B stimulées pendant 3 jours avec le cocktail et stimulées ou non avec rIL-24 sur deux temps différents : temps précoce (6h) et temps tardif (36h). L'ensemble des transcrits régulés dans les cellules B stimulées pendant 6h et 36h est représenté sur un diagramme de Venn (figure 28).

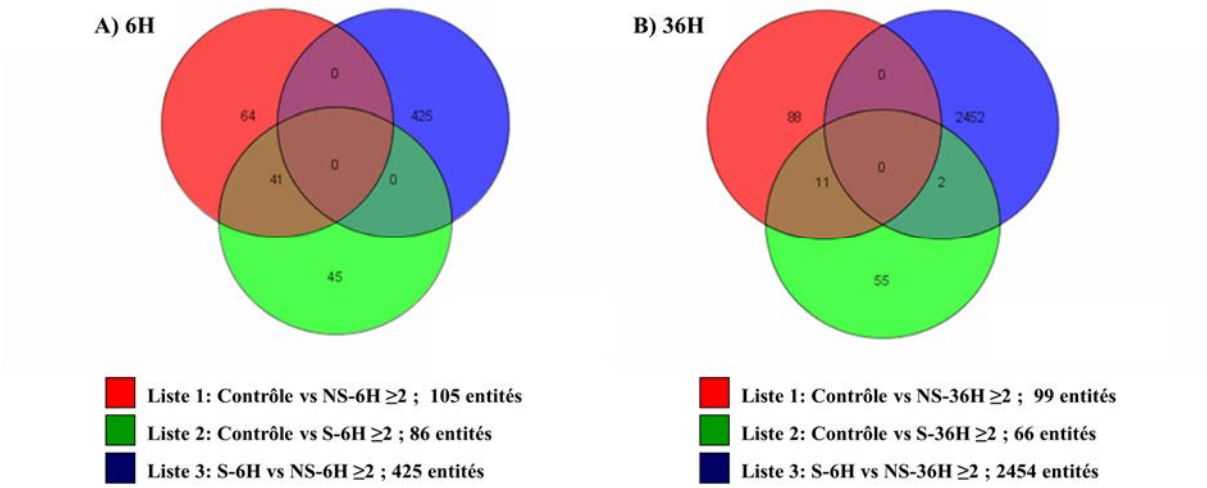


Figure 28 : Diagramme de Venn illustrant les gènes dont l'expression a été régulée par l'IL-24 dans les cellules B normales activées. Les cellules B d'amygdales purifiées (n=3) ont été cultivées pendant 3jours avec IL-10 + IL-2 + CD40-ligand (contrôle), puis avec ou sans rIL-24 pendant 6h (Panneau A) et 36h (Panneau B), avant l'extraction des ARNm et l'hybridation sur puces à ADN. Pour chaque temps, les entités (1 à 3 pour A et B) ont été générées et comparées. NS: non stimulé, S: stimulé avec IL-24. Le nombre de gènes régulés entre les deux entités est représenté au sein des cercles.

Sachant qu'il existe des gènes d'expression précoce (3h) et tardive (48h) dans de très nombreux modèles de stimulation. A titre d'exemple, un article montre que l'expression des chimiokines dans les cellules dendritiques du sang humain (cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes) suit 3 vagues d'expression : une première vague se produit à un temps précoce (de 2 à 4h), une deuxième vague entre 8 et 12h et une troisième se produit entre 24 et 48h (Piqueras et al., 2006). Cependant, nous avons utilisé une cinétique arbitraire afin de mettre en évidence des modifications « précoces » et « tardives ». Et comme par chance, cette technique a permis de démontrer une différence de cinétique d'induction par l'IL-24.

L'analyse des données avec le programme de GO (Gene Oncology) montre une régulation précoce de l'expression de 11 transcrits appartenant à la famille des gènes du "métabolisme de l'ADN". Parmi ceux-ci, 10 transcrits ont été inhibés tandis qu'en revanche les transcrits de l'IGF1ont été stimulés. En effet, les fonctions de 9 sur 10 gènes inhibés précocement (6h) sont limitées à la réplication et à la réparation de l'ADN (Tableau 10).

Gene	Name	Genebank Accession	Gene Expression	Putative Function
CDC6	Cell Division Cycle 6 homolog	*NM_001254*	downregulated	Initiation of DNA replication
CDC45L	Cell Division Cycle 45 homolog	*NM_001178010*	downregulated	Initiation of DNA replication
DMC1	Dosage suppressor of mck-1 homolog	*NM_007068*	downregulated	Homologous Recombination during Meiosis
MCM4	Minichromosome Maintenance Complex component 4	*NM_005914*	downregulated	Replication Initiation; DNA replication Fork; DNA helicase
MCM10	Minichromosome Maintenance Complex component 10	*NM_018518*	downregulated	Replication Initiation; DNA Forks
FEN1	Flap structure-specific Endonuclease 1	*NM_004111*	downregulated	DNA replication and repair
DTL	Denticeless homolog	*NM_016448*	downregulated	DNA replication and repair; Cell cycle regulation
POLE2	Polymerase Epsilon 2	*NM_001197330*	downregulated	DNA replication and repair ;Telomere maintenance; Cell cycle progression
ORC1L	Origin recognition Complex subunit 1	*NM_001190818*	downregulated	DNA replication; Assembly of initiation factors
PHB	Prohibitin	*NM_002634*	downregulated	Mitochondrial morphology/ function, transcriptional modulation
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1	*NM_000618*	**upregulated**	Promotes cell growth, anabolism, inhibits apoptosis, decreases GH and insulin release

Tableau 10 : Gènes de la voie du métabolisme d'ADN dont l'expression est stimulée ou inhibée par l'IL-24 (>2fold) dans les cellules B.

En outre, nous avons observé une stimulation tardive (36h) de 5 « gènes mitochondriaux » liés à l'apoptose. Ces transcrits codent pour les effecteurs d'apoptose : caspase 8, Bax, Bid et sous-unités du cytochrome c oxydase COX6C et COX7B (tableau 11). Par contre, nous avons observé une inhibition des gènes intervenant dans la défense cellulaire (à l'exception de CXCL9) (tableau 12).

Gene	Name	Genebank Accession	Gene Expression	Putative Function
Casp8	Caspase 8	NM_001080124	upregulated	Fas-induced AICD
Bax	BCL2-associated X protein	NM_004324	upregulated	apoptotic activator p53-mediated cell death
Bid	BH3 interacting domain death agonist	NM_001196	upregulated	cleaved by casp8 to induce cytochrome c release
Cox6C	cytochrome c oxidase subunit VIc	NM_004374	upregulated	catalyzes the electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen
Cox7b	cytochrome c oxidase subunit VII	NM_001866	upregulated	catalyzes the electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen

Tableau 11 : Gènes de la voie d'apoptose mitochondriale dont l'expression est stimulée ou inhibée par l'IL-24 (>2fold) dans les cellules B.

Gene	Name	Genebank Accession	Gene Expression	Putative Function
CXCL9	Chemokine(C-X-C motif) ligand 9	NM_002416	upregulated	T cell trafiking; cellular defense response
CCL5	Chemokine(C-C motif) ligand 5	NM_002985	downregulated	HIV- suppressive factor
CCR5	Chemokine(C-C motif) receptor 5	NM_000579	downregulated	cellular defense response; virus-host interaction
CSF2	Colony stimulating factor2(granulocyte-macrophage)	NM_000758	downregulated	Production, differentiation and function of granulocytes and macrophages
KIR2DL4	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	NM_001080770	downregulated	cellular defense response; regulation of immune response
NCR1	Natural cytotoxicity receptor 1	NM_001145457	downregulated	cellular defense response; NK cell activation
CD244	Natural killer cell receptor 2B4	NM_001166663	downregulated	Regulation of NK-cell cytolytic activity

Tableau 12 : Gènes impliqués dans la défense cellulaire dont l'expression est stimulée ou inhibée par l'IL-24 (>2fold) dans les cellules B.

Pour confirmer les résultats des biopuces, nous avons validé les données par RT-PCR (figure 29 à gauche) et par PCR en temps réel (Figure 30). Etant donné que l'IL-24 était cytostatique et tue la fraction en cycle des cellules de LLC stimulées par IL-2 (Sainz-Perez et al., 2008), nous avons étudié les transcrits ci-dessus dans les cellules B de LLC. Sur deux expériences représentatives d'une LLC IgVH muté (M CLL) et une non muté (UM CLL), l'IL-24 induit l'expression de l'IGF-1, tandis que les autres transcrits ont été variablement inhibés (figure 29

à droite). L'image est variable au sein d'échantillons leucémiques et même parmi les échantillons de LLC mutés et non mutés (données non présentées).

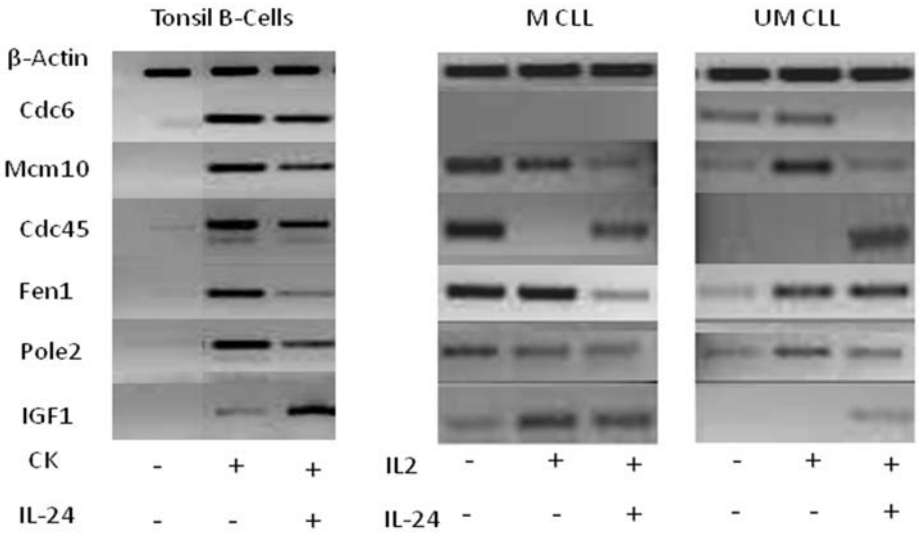


Figure 29 : Etude de l'expression des gènes précoces (6h) régulés par l'IL-24 par RT-PCR dans les cellules B. Les cellules B purifiées à partir des amygdales (n=3) ont été stimulées comme dans la figure 28. Les cellules B de LLC ont été stimulées avec l'IL-2 pendant la nuit suivie ou non par une stimulation de 100 ng/ml d'IL-24 pendant 6h avant la purification et la RT des ARNm.

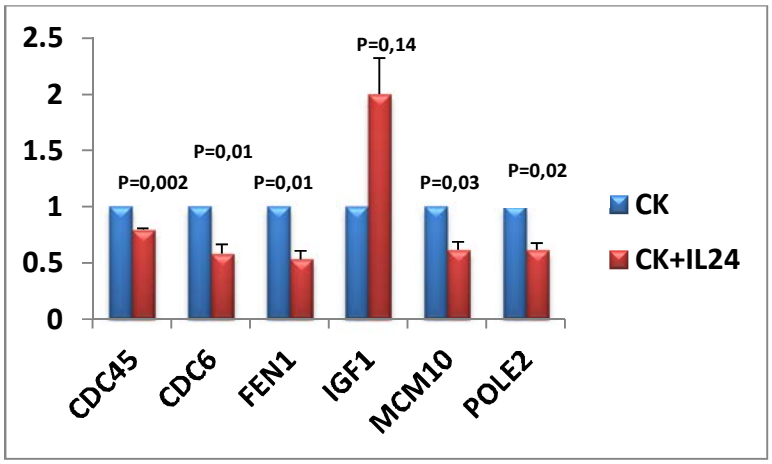


Figure 30 : Etude de l'expression des gènes précoces (6h) régulés par l'IL-24 par PCR en temps réel dans les cellules B d'amygdales. La quantification des ARNm CDC45, CDC6, FEN1, IGF1, MCM10 et POLE2 des cellules co-stimulées par le cocktail CK (IL2 + IL10 + CD40L) et IL-24 (histogrammes rouges) a été normalisée par rapport à celle des cellules stimulées par le cocktail CK seul. n=3, moyenne ± SD, les valeurs p ont été calculées par le test-Student.

Contrairement aux transcrits qui ont été inhibés à 6h, les transcrits de l'IGF-1 étaient plus abondants dans les échantillons stimulés par l'IL-24 à 6h (tableau 9). C'était un peu inattendu vue que l'IGF-1 était rapporté comme étant un facteur de croissance universel pour les cellules de mammifères, y compris les lymphocytes et les organes lymphoïdes (Clark et al., 1993; Heemskerk et al., 1999; Zapf et al., 1989). Pour écarter la contradiction potentielle entre les effets respectifs de l'IGF-1 et l'IL-24, nous avons étudié l'expression et les effets de l'IGF-1 sur les cellules B.

2 Régulation de l'expression de l'IL-24 dans les lymphocytes B normaux.

Le travail précédent de Maarof et al. a démontré que les transcrits de l'IL-24 étaient inhibés après l'activation *in vitro* des cellules B normales (B du CG) par un anti-IgM à 48h. Cette inhibition était plus significative en activant les cellules avec un anti-IgM plus un CD40L trimérique. En revanche les résultats ne sont pas significatifs en activant les cellules par la voie des TLRs (LPS et CPG) (Maarof et al., 2010). De manière intéressante, l'expression des transcrits de l'IL-24 au bout de 5 jours d'activation des cellules B a été augmentée fortement (20 à 25 fois) avec l'anti-IgM plus CD40L trimérique.

Dans notre travail, nous avons voulu savoir dans quel contexte T-dépendant l'expression de l'IL-24 est régulée. Pour cela, nous avons purifié les cellules B d'amygdales et les avons co-stimulés par anti-IgM+CD40L trimérique et différentes cytokines. Les ARNm ont été extraits après 1, 3 et 5 jours. L'analyse par qPCR montre qu'après 24h de stimulation, l'expression de l'IL-24 a été augmentée significativement par l'IL4 (contexte Th2) et plus faiblement par l'IL-22 (contexte Th17). Par contre, à J5, l'expression de l'IL-24 a été augmentée significativement dans un contexte plutôt Th1 (INFγ) ou bien Th17 (IL-22). Cette expression est significativement inhibée sous l'action de l'IL-4 (contexte Th2) (figure 31, page suivante).

L'ensemble de nos données suggère donc que l'expression de l'IL-24 est fortement régulée dans les cellules B humaines au cours de la réponse aux antigènes T-dépendant

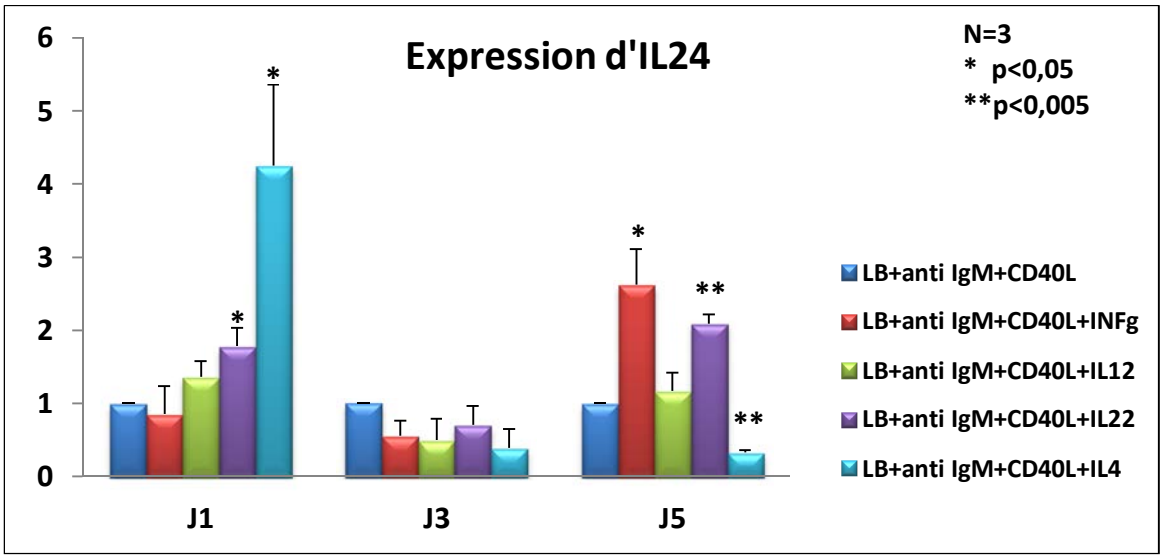


Figure 31 : Analyse de la régulation de l'expression de l'IL-24 par PCR en temps réel dans les cellules B d'amygdales. La quantification de l'ARNm IL-24 dans les LB en fonction de différents stimuli (INFg, IL12, IL22 et IL4) a été normalisée par rapport aux cellules co-stimulées par antiIgM et CD40L seuls. n=3, moyenne ± SD, les valeurs p ont été calculées par le test-Student.

3 Expression du récepteur de l'IL-24 dans les lymphocytes B

L'IL-24 possède deux types de récepteurs (R1 et R2). Ces récepteurs sont des hétérodimères constitués de la chaîne commune, IL-20Rβ, s'associant soit à la chaîne IL-20Rα pour former le récepteur de type 1, soit à la chaîne IL-22Rα1 pour former le récepteur de type 2.

Afin de connaitre quelles sont les cellules répondeuses à la stimulation par l'IL-24, nous avons analysé l'expression de récepteurs de l'IL-24 par FACS dans différentes populations cellulaires d'amygdales et de PBMC. Trois anticorps monoclonaux dirigés contre les trois chaines du récepteur de l'IL-24 ont été utilisés : anti-IL-20Rα-PE, anti-IL-20Rβ-Biotine suivi de Streptavidine-PC5 et anti- IL-22Rα1-APC.

Nous avons constaté qu'à l'état basal les cellules B d'amygdales n'expriment pas les chaînes IL-20Rα et IL-20Rβ, et faiblement la chaîne IL-22Rα1 (figure 32, page suivante). Une stimulation de cellules par LPS induit l'expression de la chaîne commune IL-20Rβ (figure 32).

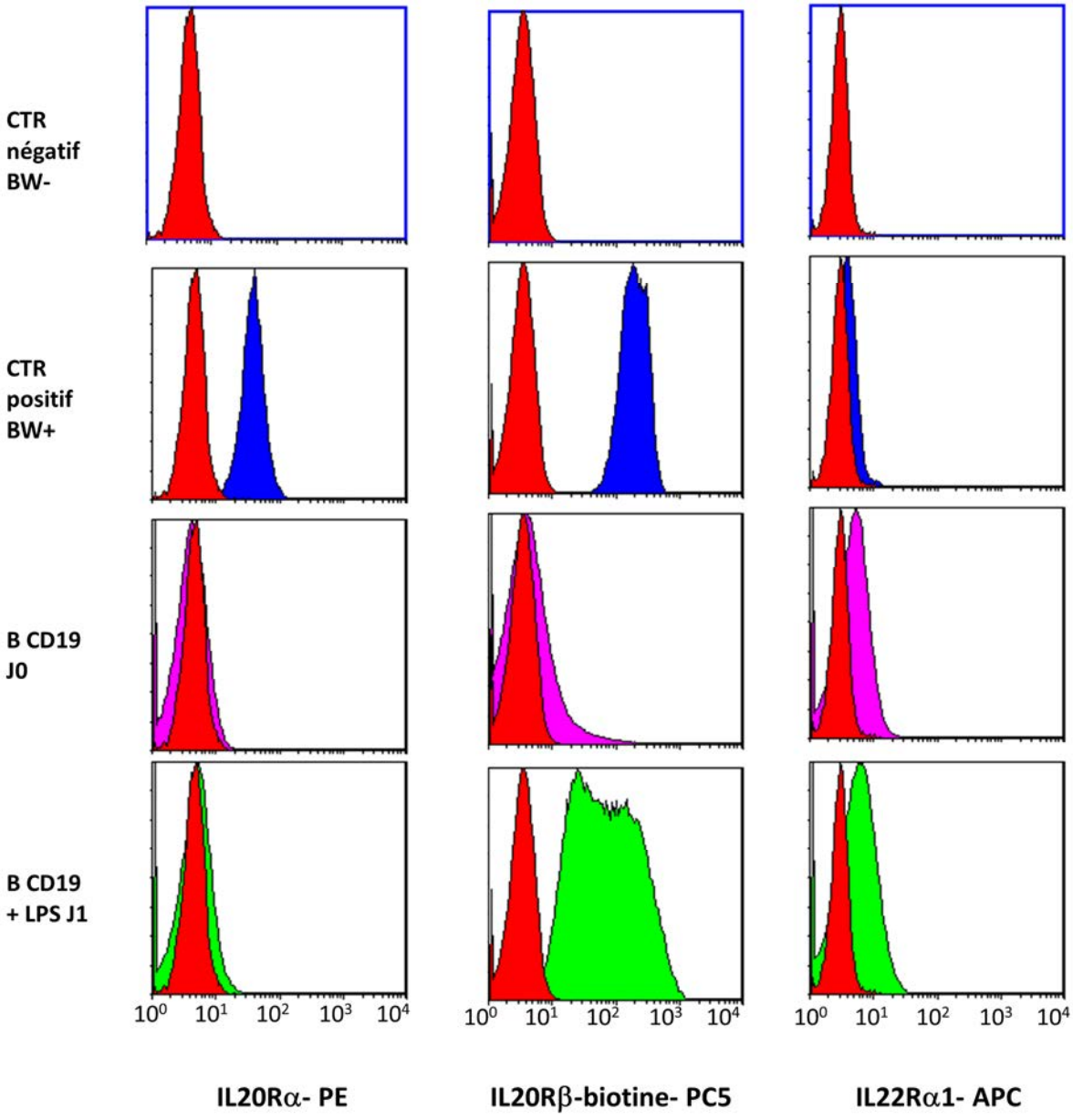


Figure 32 : Analyse de l'expression de récepteurs de l'IL-24 par FACS par les cellules B d'amygdales stimulées ou non par LPS. A l'état basal, ces cellules n'expriment pas les chaines IL-20Rβ, IL-22Rα1 ni IL-22Rα1. Le LPS induit l'expression des chaînes IL-20Rβ et IL-22Rα1 à la surface de ces cellules, mais pas de la chaîne IL-20Rα. Ainsi, seul le récepteur de type 2 de l'IL-24 est exprimé par les cellules B d'amygdales. (Lignée BW : contrôle positif de l'expression des chaînes IL-20Rα et IL-20Rβ).Ces résultats sont représentatifs de 5 expérimentations différentes.

Un profil d'expression similaire a été observé dans les cellules T CD3 d'amygdales (figure 33, page suivante). Ces cellules exprimant à l'état basal le récepteur de type 1 de l'IL-24 et le récepteur de type 2 une fois stimulées par LPS. Par contre le profil des monocytes (CD14)

diffère de celui des cellules B et T. Ces cellules exprimant à l'état basal les trois chaînes IL-20Rα, IL-20Rβ et IL-22Rα1(figure 34, page suivante).

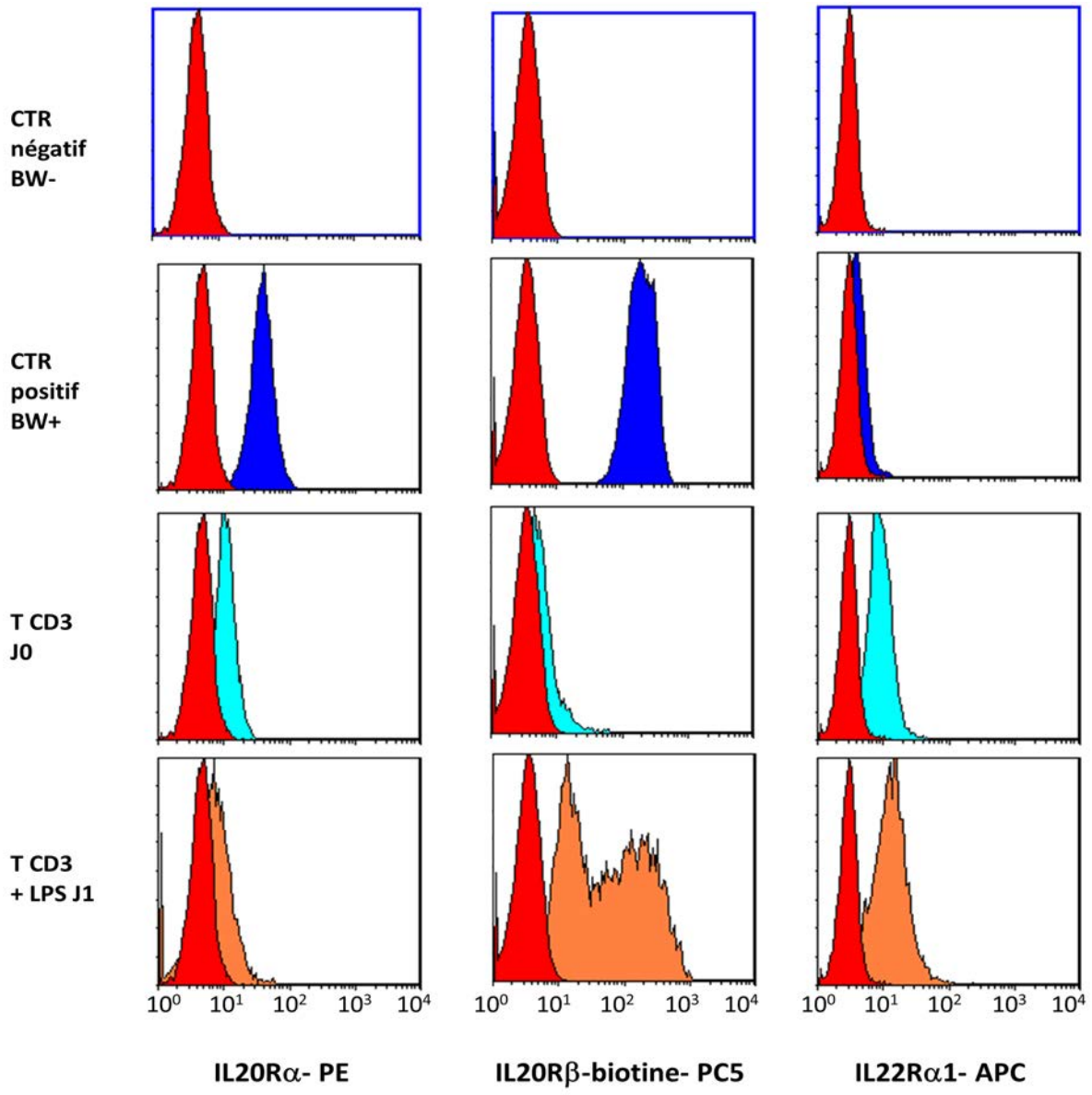


Figure 33 : Analyse de l'expression de récepteurs de l'IL-24 par les lymphocytes T d'amygdales stimulés ou non par LPS. A l'état basal, ces cellules expriment faiblement les chaînes IL-20Rα et IL-22R mais pas la chaîne IL-20Rβ. Le LPS induit l'expression des chaînes IL-20Rβ et d'IL-22Rα1, mais pas IL-20Rα. (Lignée BW : contrôle positif de l'expression des chaînes IL-20Rα et IL-20Rβ).Ces résultats sont représentatifs de 5 expérimentations différentes.

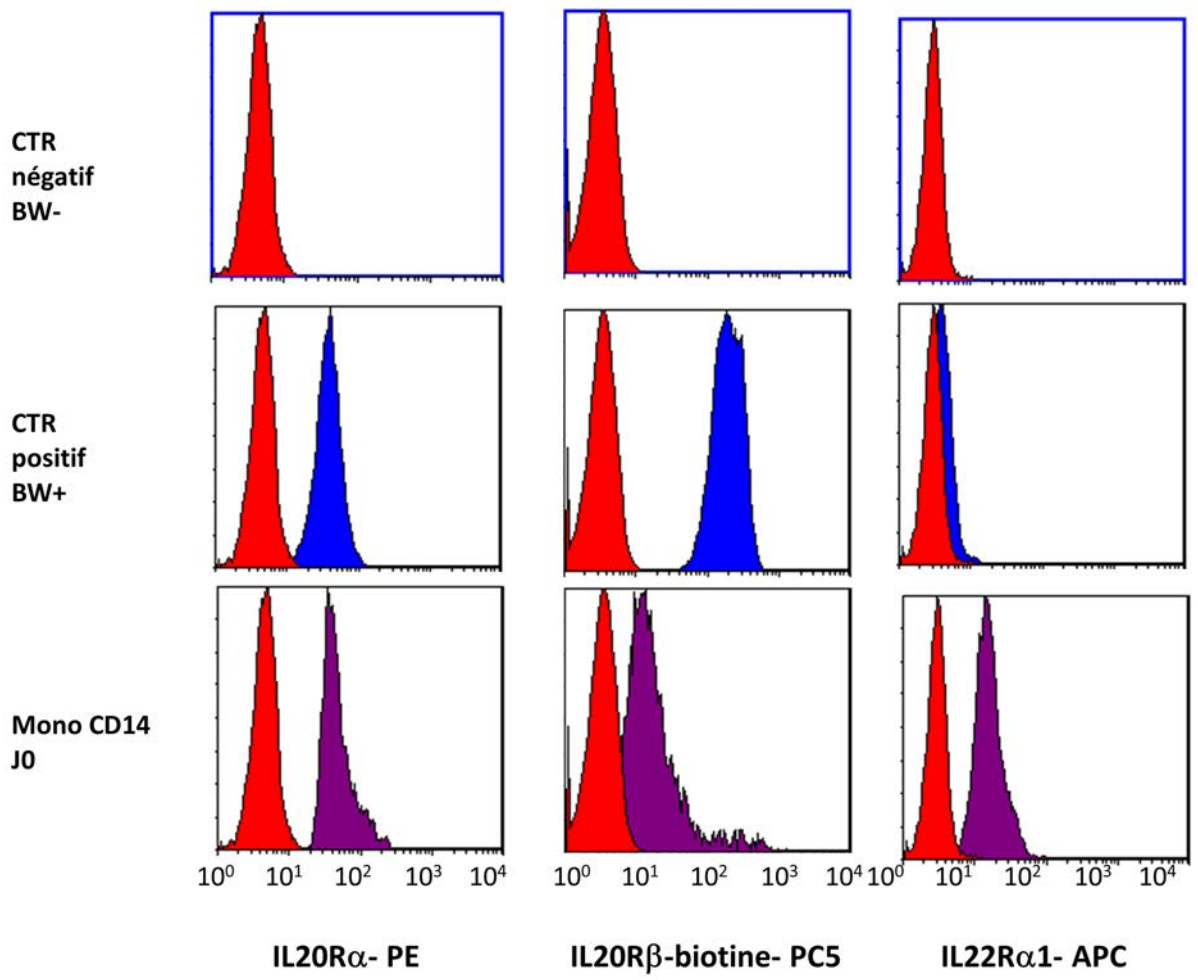


Figure 34 : Analyse de l'expression de récepteurs de l'IL-24 par les Monocytes d'amygdales à l'état basal. A l'état basal, ces cellules expriment les trois chaînes IL-20Rα, IL-20Rβ et IL-22R. (Lignée BW : contrôle positif de l'expression des chaînes IL-20Rα et IL-20Rβ).Ces résultats sont représentatifs de 5 expérimentations différentes.

Nous avons constaté que les cellules B et T n'ont pas le même profil d'expression de récepteurs de l'IL-24 en fonction de leur localisation sanguine ou dans les amygdales : dans le sang, ces cellules expriment le récepteur de type 2 de l'IL-24 à l'état basal (chaînes IL-20Rβ et IL-22Rα1). Par contre les monocytes circulants ont le même profil d'expression que les monocytes d'amygdales (ils expriment les trois chaînes IL-20Rα, IL-20Rβ et IL-22Rα1) (figure 35, page suivante).

Dans ces expériences, nous avons utilisé comme contrôle une lignée BW5147 (lymphome-T souris) transfectée par un vecteur vide (BW-) ou par IL-20Rα plus IL-20Rβ humaines (BW+). L'hétérodimère IL-24R1 a été donné par M. le docteur J-C Renauld.

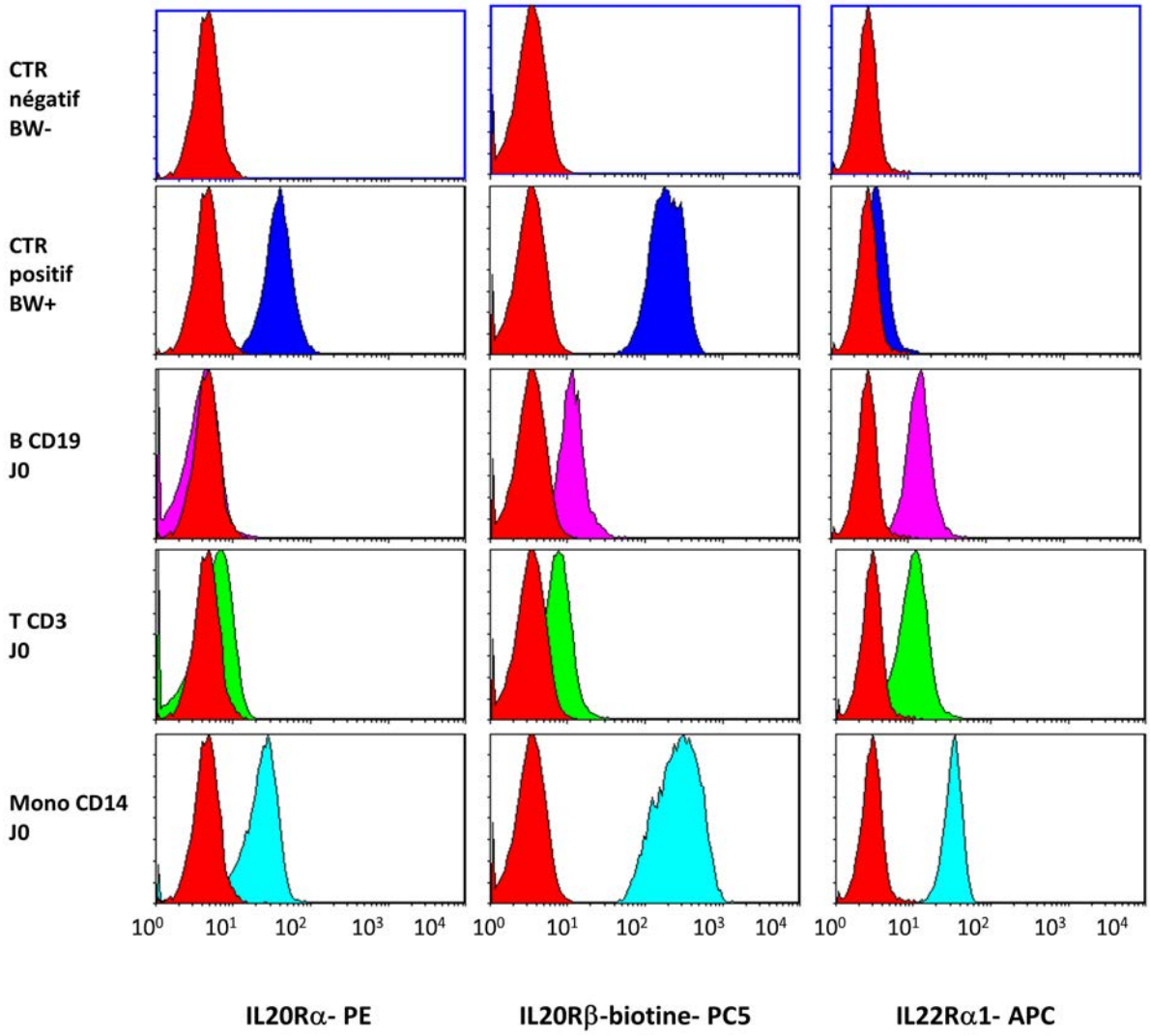


Figure 35 : Analyse de l'expression des récepteurs de l'IL-24 par les cellules B, T et Monocytaires périphériques (PBMC). (Lignée BW : contrôle positif de l'expression des chaînes IL-20Rα et IL-20Rβ). Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations différentes.

4 Expression du récepteur de l'IGF1 par les lymphocytes B d'amygdales ainsi que ceux de la LLC

Dans le but de comprendre le rôle de l'IGF1 dans notre modèle, nous avons d'abord analysé l'expression du récepteur à l'IGF-1 par les cellules B. Pour cela, 7 patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (2 non mutée pour le gène IgHV, 3 muté et 2 avec un statut inconnu), ainsi que 7 amygdales différentes ont été utilisés comme sources de cellules B. Ni les cellules B de LLC ni les cellules B d'amygdales humaines n'expriment l'IGF1-R à l'état basal (figure 36, page suivante). Cependant ce récepteur a été induit par la stimulation. Nous avons observé

une induction de l'expression membranaire de l'IGF1R lorsque nous stimulions les cellules B normales ou malignes par CD40-ligand, anti-IgM, CpGODN et SDF1/CXCL12. Par contre l'expression de l'IGF1-R n'a pas été modifiée par l'addition d'IL-24 à la culture. Notons que l'expression de l'IGF1R est moins inductible dans les cellules B de LLC que dans les cellules B d'amygdales (figure 36). Finalement, plusieurs stimuli spécifiques ou non de l'antigène induisent l'expression de l'IGF1R et sensibilisent les cellules B normales et malignes à l'action de l'IGF-1.

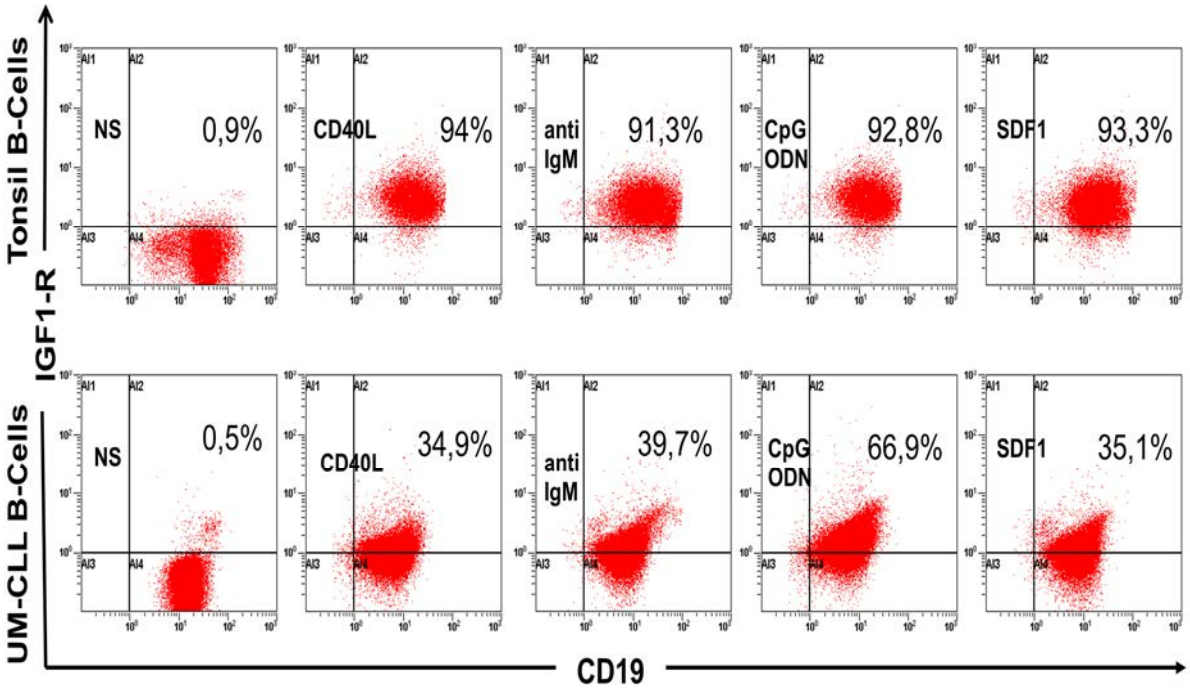
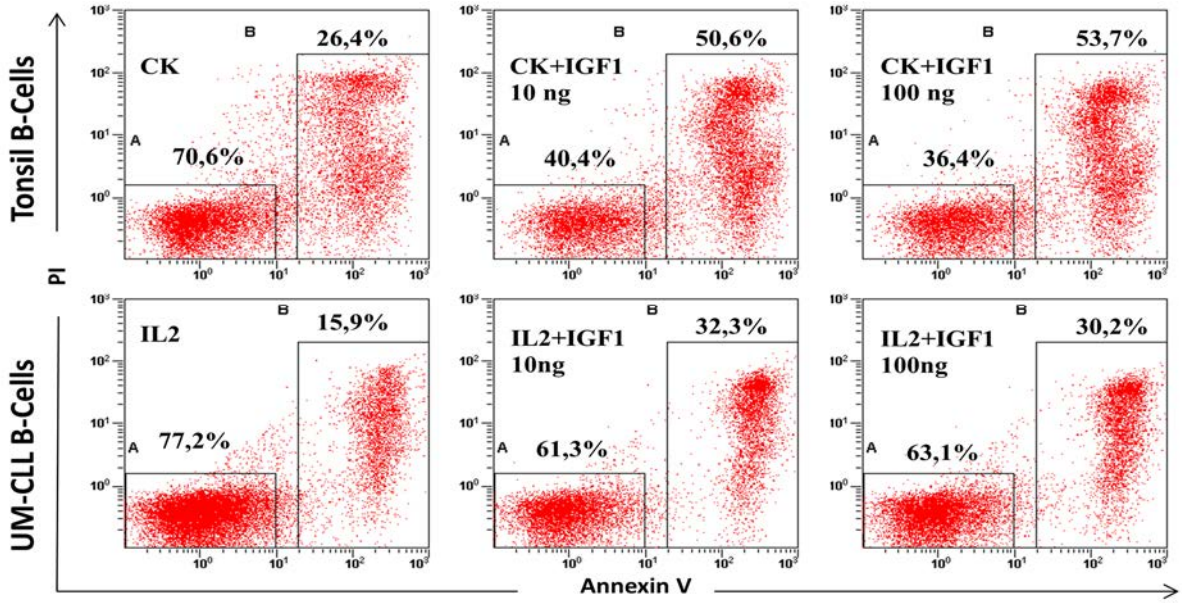


Figure 36 : Expression de l'IGF1-R par les cellules B normales et leucémiques. Cette expression a été mesurée par cytométrie en flux sur des cellules B purifiées (normales et leucémiques) après 48h de culture avec les stimuli indiquées. Le pourcentage de cellules IGF1-R positives est indiqué dans le quadrant 2. n=7.

Nous avons ensuite incubé les cellules B des amygdales IL-2 et IL-10 comme décrit plus haut pendant 3 jours puis avec 0, 10 ou 100 ng/ml d'IGF-1 pendant 2 jours supplémentaires. Les cellules B de LLC ont été incubées avec 100 ng/ml d'IL-2 pendant la nuit suivie ou non par une incubation avec IGF1 comme mentionné plus haut. Comme montré par la technique de coloration avec l'annexine V et l'iodure de propidium (PI) (Figure 37a, page suivante), l'IGF1 à 10 ng/ml a été préjudiciable à la survie cellulaire. En plus, l'IGF1 diminue le pourcentage de cellules en phase G0/G1 et parallèlement augmente celui de cellules hypodiploïdes (phase sub G0), dans le même échantillon de LLC (Figure 37b, page suivante). Au total, ces résultats

sont en accord avec un effet cytostatique de l'IGF1 sur les cellules B activées, et suggèrent que l'induction de l'IGF-1 par l'IL-24 est physiologiquement pertinente.

(a)



(b)

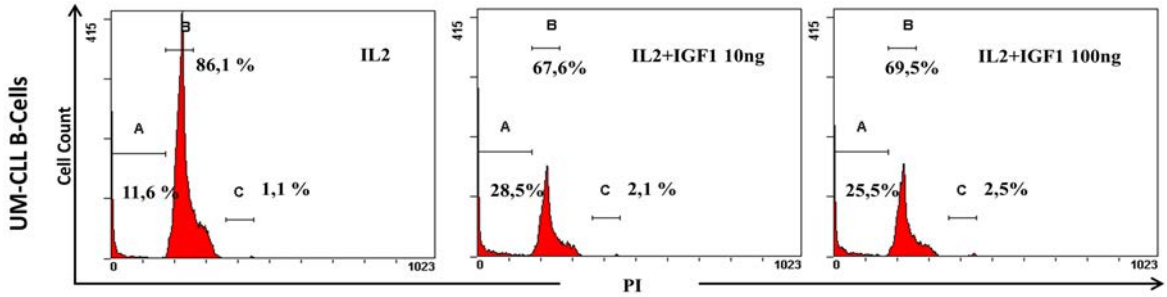


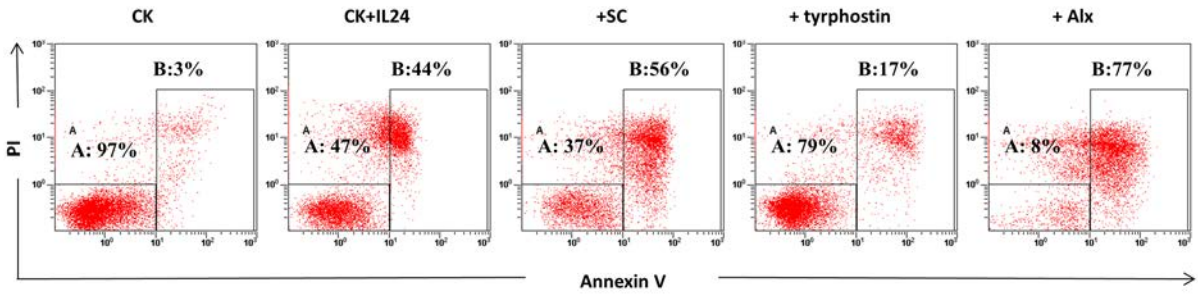
Figure 37 : Etude des effets de l'IGF-1 sur les cellules B normales et celles de LLC. (a) l'apoptose induite par l'IGF-1 a été déterminée par la technique de coloration d'AnnexinV-PI sur des cellules B stimulées par le cocktail (CK) d'IL2 + IL10 + CD40L, puis par IGF1 (10 et 100 ng/ml) (amygdales) ou par IL2 suivie d'IGF1 (LLC). (b) le cycle cellulaire a été réalisée sur la même LLC analysée ci-dessus. n=3.

5 L'inhibition de la voie de signalisation de l'IGF1 reverse les effets biologiques de l'IL-24

Afin de déterminer si l'IGF1 agit en aval de l'IL-24 dans le but de promouvoir la mort cellulaire dans les cellules B, nous avons activé les cellules B d'amygdales avec le cocktail de cytokines comme ci-dessus, puis les avons incubés avec divers inhibiteurs d'IGF1 à des concentrations et des temps divers, avant d'ajouter l'IL-24 recombinante à la culture. Comme

le montre la figure 31a, seulement un inhibiteur pharmacologique sur les trois testés, la tyrphostine AG, a réussi à inverser l'effet apoptotique de l'IL-24 (44% mort cellulaire sous l'IL-24 versus 17% chez des cellules incubées avec tyrphostine et stimulées par la suite avec rIL-24). En revanche, les inhibiteurs ALX et SC étaient inactifs dans ce domaine, et ont même montré un effet additif à celui de l'IL-24 (figure 38a). En outre, à une concentration optimale (5µM) et un temps d'incubation court (6h), la tyrphostine inhibe l'expression des transcrits de Cox7b, CASP8, Bax induite par l'IL-24 comme indiqué par qPCR (figure 38b). L'observation selon laquelle un inhibiteur spécifique d'IGF1 antagonise l'effet de l'IL-24 suggère fortement que l'IGF1 agit en aval de l'IL-24 dans l'induction de l'apoptose des cellules B.

(a)



(b)

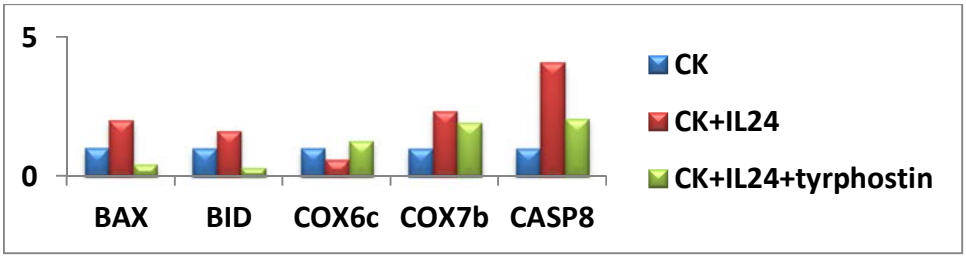


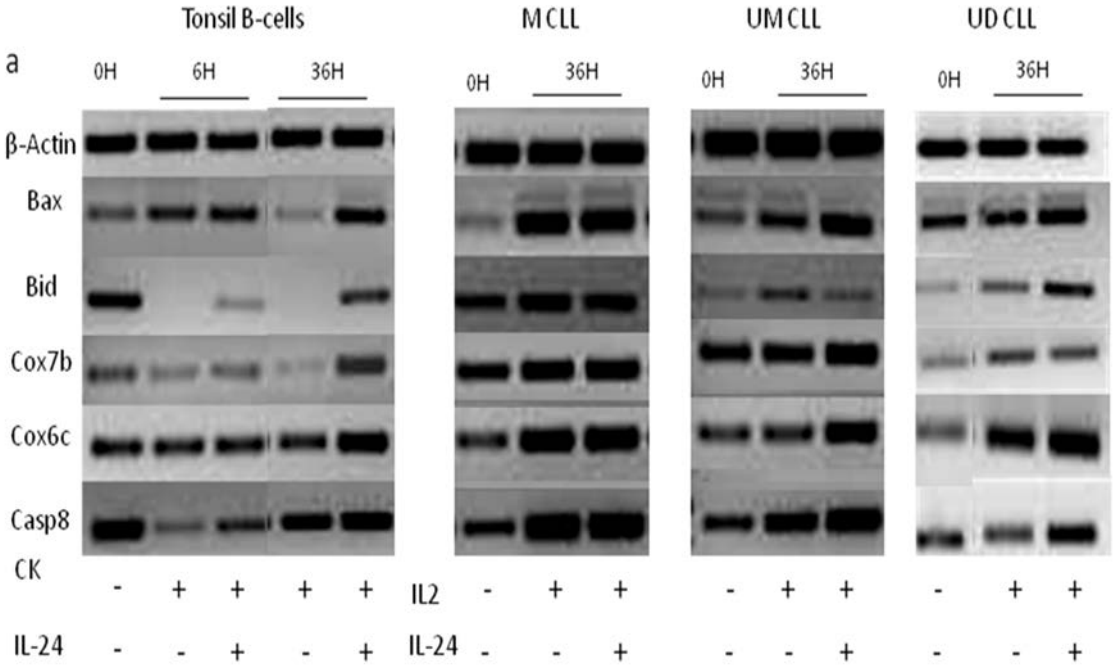
Figure 38 : L'inhibition de la voie d'IGF1 inverse les effets biologiques de l'IL-24. (a) les cellules B d'amygdales ont été stimulées avec le cocktail, puis incubées avec différents inhibiteurs de l'IGF1 (5 µM pendant 6 heures), avant stimulation par rIL-24. L'apoptose a été analysée par la technique d'annexinV-PI 3 jours après. Les inhibiteurs sont : SC (sc-205907), tyrphostine (ALX-270-217), l'ALX (ALX-270-362). (b) Les cellules ont été incubées avec tyrphostine avant la q-PCR des gènes de la voie d'apoptose mitochondriale (à J3). n=3.

6 IL-24 induit la voie d'apoptose mitochondriale dans les lymphocytes B activés

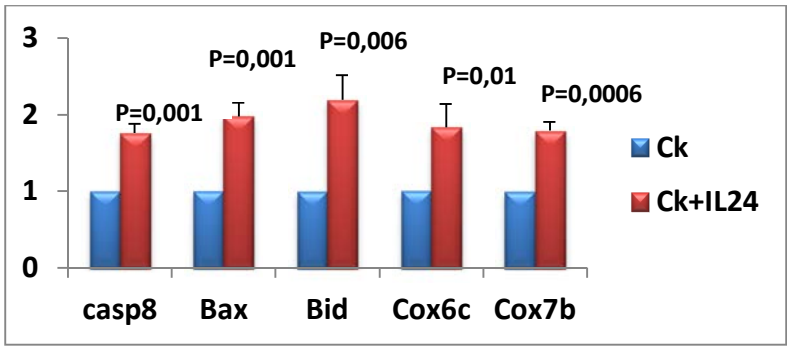
Les résultats des expériences des biopuces ont montré que l'IL-24 module l'expression de plusieurs gènes liés à la prolifération cellulaire ou à la mort en deux vagues. La première

vague (6h) est liée au métabolisme de l'ADN, tandis que la seconde (36h) est reliée à la voie de l'apoptose (intrinsèque) mitochondriale. Les transcrits tardifs (36h) ont été validés par RT-PCR sur des cellules B d'amygdales et des cellules B leucémiques (un échantillon de cellules B d'amygdale, et 3 échantillons de LLC avec un statut d'IgV muté, non muté ou indéterminée) (figure 39a) et par qPCR sur les cellules B d'amygdales (figure 39b). La protéine Caspase 8 a été étudiée par western blot et s'est révélée être soit augmentée ou induite par l'IL-24 dans les cellules B normales ou dans la LLC respectivement (figure 39c, page suivante). Nous avons enfin étudié l'effet de l'IL-24 sur le potentiel de la membrane mitochondriale comme indicateur spécifique de l'apoptose intrinsèque. Comme le montre la figure 38d, page suivante, le potentiel mitochondrial constaté par le colorant fluorescent NIR, diminue de façon significative sous l'effet d'IL-24.

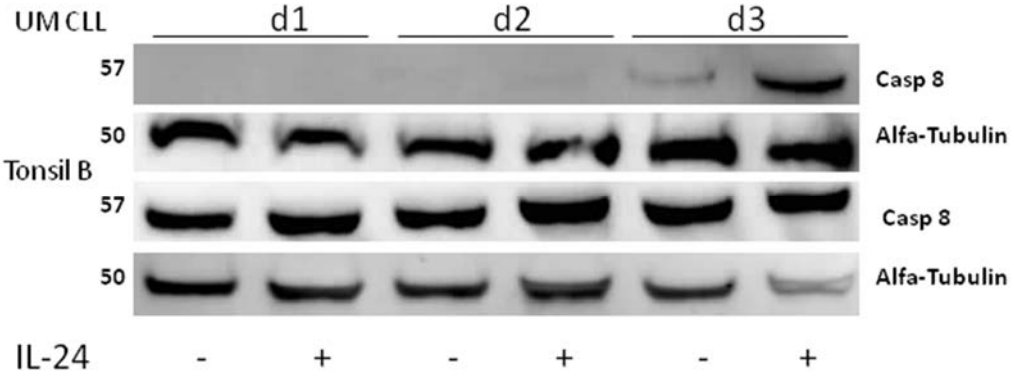
(a)



(b)



(c)



d)

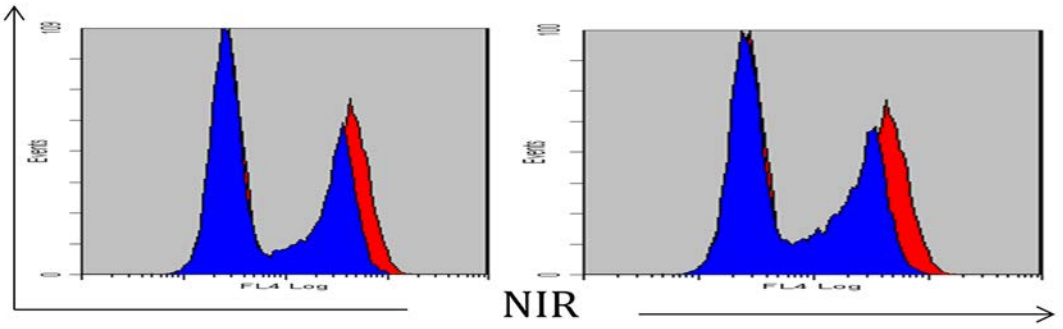


Figure 39 : (a) Etude de l'expression des gènes régulés par l'IL24 à 36h par RT-PCR. Les cellules B d'amygdales ont été cultivées avec le cocktail (CK), tandis que les échantillons de LLC (LLC IgVH l muté, LLC non mutée et une LLC non déterminée) ont été stimulés pendant une nuit avec l'IL-2 puis par l'IL-24. (b) L'expression des gènes a été validé par qPCR sur 3 amygdales différentes (moyenne ± SD expression relative des cellules stimulées ou non avec l'IL-24). (c) la protéine Casp 8 a été analysée par western blot dans les mêmes conditions de culture. (d) le potentiel de la membrane mitochondriale a été mesuré dans les échantillons ci-dessus au moyen de la sonde NIR en cytométrie en flux A gauche : cellules B d'amygdales, à droite : cellules B de LLC. l'histogramme rouge : CK ou IL2 seul, et l'histogramme bleu : stimulées par IL-24, respectivement.

7 L'apoptose des lymphocytes B activés induite par l'IL'24 est p53 dépendante

Nous avons déjà constaté que l'apoptose induite par l'IL-24 dans les cellules B de LLC pourrait être évitée par pré-incubation des cellules avec pifithrin alpha, un inhibiteur pharmacologique de la transactivation de p53 (Sainz-Perez et al., 2008). De plus, nous avons suggéré que l'IL-24 dé-réprime l'expression de p53 en partie par déphosphorylation de STAT3 sur tyrosine (Sainz-Perez et al., 2008 ; Maarof et al., 2010). Afin de valider cette hypothèse sur les cellules B normales, nous avons stimulé les cellules B d'amygdales avec le

cocktail précédemment mentionné pendant 3 jours, puis par de la pifithrin alpha ou l'inhibiteur de caspase zVAD-fmk pendant 1 heure, pour finalement les stimuler avec l'IL-24 pendant 24 heures. Comme le montre la technique d'annexine V-PI (figure 40), pifithrin-alpha et zVAD étaient capables d'antagoniser l'effet apoptotique de l'IL-24 (pifithrin-alpha et zVAD n'avaient aucun effet toxique propre).

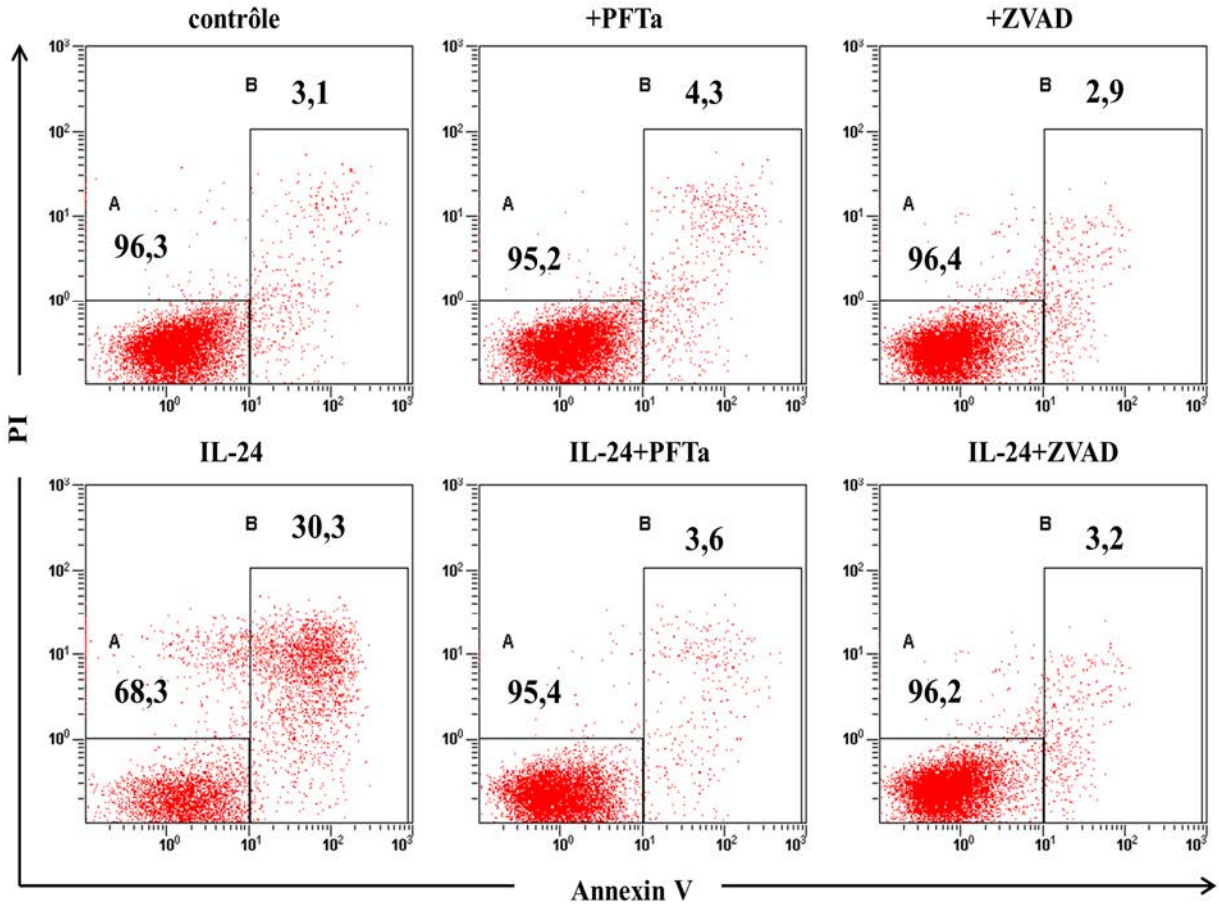
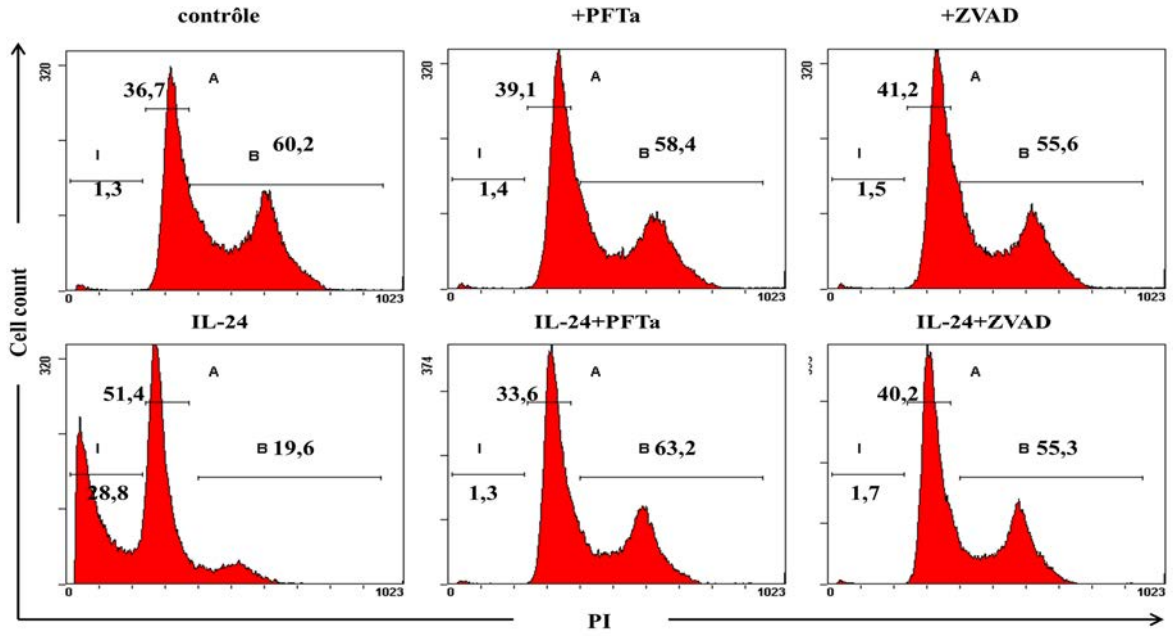


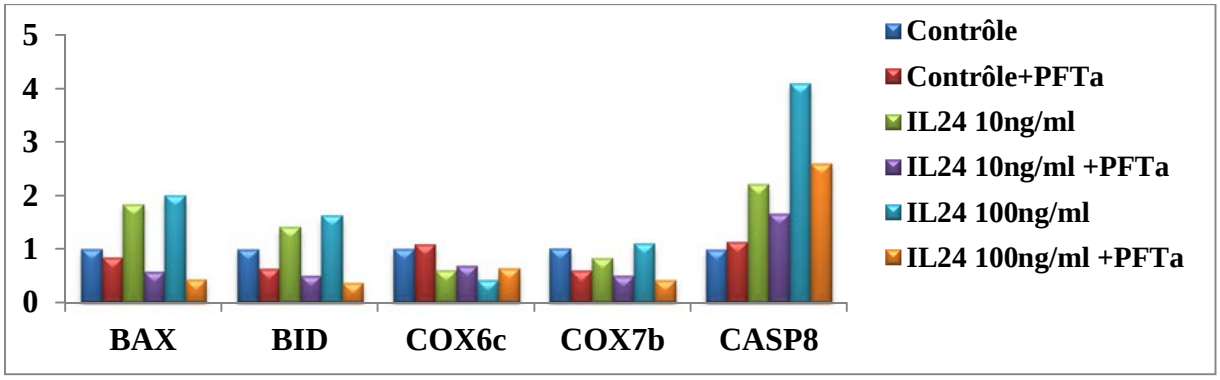
Figure 40 : La mort cellulaire induite par IL-24 est p53-dépendante et est inversée par les inhibiteurs de p53 et de caspase. Les cellules B d'amygdales ont été stimulées avec le cocktail (contrôle) et incubées ou non avec 10µM de pifithrine-alpha (α PFT) ou ZVAD-fmk, pendant 1h, puis avec 100 ng/ml d'IL-24 pendant 24 h. L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux (dot plots). N=3.

La Pifithrin alpha a également bloqué l'effet cytostatique de l'IL-24 sur les cellules B, comme indiqué par l'analyse du cycle cellulaire (figure 41a page suivante), ainsi que la transcription des gènes de la voie de l'apoptose mitochondriale (BAX, BID, COX6c, COX7b et CASP8) induite par l'IL-24 (figure 41b page suivante). Cette inhibition a été confirmée au niveau protéique par Western Blot pour CASP8 (figure 41c page suivante).

(a)



(b)



c)

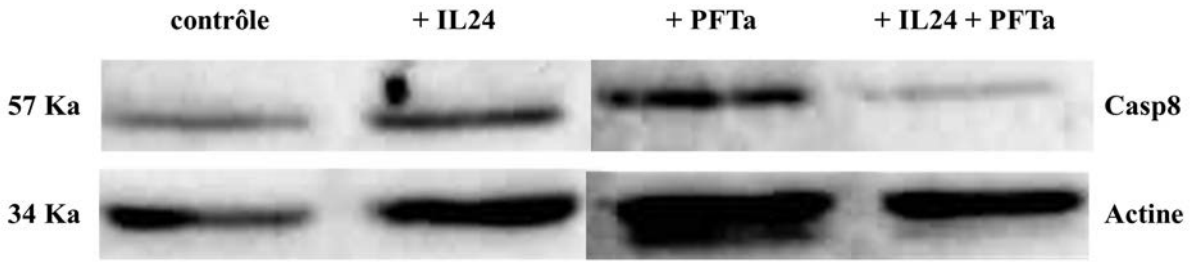


Figure 41 : La mort cellulaire induite par IL-24 est p53-dépendante et est inversée par les inhibiteurs de p53 et de caspase. Les cellules B d'amygdales ont été stimulées avec le cocktail (contrôle) et incubées ou non avec 10µM de pifithrine-alpha (α PFT) ou ZVAD-fmk, pendant 1h, puis avec 100 ng/ml d'IL-24 pendant 24 h. (a) analyse du cycle cellulaire (% de cellules hypodiploïdes sous IL-24 est montré en icône noire). (b) q-PCR des transcrits BAX, BID, COX6c, COX7b et CASP8. (c) Analyse par Western Blot de CASP8. N=3.

Leukemia & Lymphoma, 2012; Early Online: 1–11
© 2012 Informa UK, Ltd.
ISSN: 1042-8194 print / 1029-2403 online
DOI: 10.3109/10428194.2012.717079

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Interleukin-24 mediates apoptosis in human B-cells through early activation of cell cycle arrest followed by late induction of the mitochondrial apoptosis pathway

Nader Hadife[1], Christophe Nemos[2], Jean-Pol Frippiat[3], Tala Hamadé[1], Aurore Perrot[4] & Ali Dalloul[1]

[1]*EA 4369,* [2]*EA 4368 and* [3]*JE 2537, Université de Lorraine, Nancy, France and* [4]*Service de Médecine Interne–Hématologie, CHU Nancy, France*

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

Abstract

Interleukin (IL)-24 has death-promoting effects on various proliferating cells including B-cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) and germinal center B-cells, but its molecular mechanisms are poorly understood. Using a B-cell differentiation model and mRNA profiling, we found that recombinant (r)IL-24 stimulated genes of the mitochondrial apoptotic pathway (Bax, Bid, Casp8, COX6C, COX7B) after 36 h, whereas the transcription of genes involved in DNA replication and metabolism was inhibited within 6 h. Unexpectedly, insulin-like growth factor 1 (IGF1), a hormone known to promote cell growth, was stimulated by IL-24. Activated B-cells express receptor for IGF1, to which they become sensitized and undergo apoptosis, a mechanism similar in this respect to IL-24-induced cell death. Furthermore, inhibition of the IGF1 pathway reversed the effects of IL-24. IL-24-mediated apoptosis was also antagonized by pifithrin-alpha, an inhibitor of p53 transactivation. Altogether, these results disclose sequential molecular signals generated by IL-24 in activated B-cells.

Keywords: IL-24, apoptosis, B-cells, gene arrays

Copyright © 2012 Informa Healthcare
Not for Commercial Distribution
Unauthorised use prohibited. Authorised users can download, display, view and print a single copy for personal use

Introduction

Interleukin-24/melanoma differentiation-associated gene-7 (IL-24/MDA-7) was studied initially in the context of its activity as a tumor suppressor [1–3]. By contrast, the immune function of IL-24 has been investigated only recently. Lymphocytes can be stimulated to produce IL-24, which in turn stimulates the production of T-helper cell type 1 (TH1) cytokines by peripheral blood mononuclear cells [4,5]. IL-24 is also produced by, and acts on, keratinocytes, and displays overlapping functions with other members of the IL-20 family of cytokines [6–8]. We previously found that recombinant IL-24 selectively induced the apoptosis of cells engaged in proliferation of B-lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia, while sparing quiescent cells [9]. IL-24 also inhibited plasma cell differentiation of normal B-cells apparently by blocking cell cycle progression and killing large proliferative plasma cell precursors [10]. Thus, at least in human lymphocytes expressing receptors for IL-24, the action of IL-24 was not mediated by the induction of other cytokines but was direct. Indeed, IL-24 directly killed proliferating cells in part by stabilizing p53 or relieving the suppressive effect of pSTAT3 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3) on the transcription of p53 [9].

MDA-7 was discovered in terminally differentiated melanocytes, whereas it is repressed in malignant melanocytes [11]. Likewise, in the immune system, IL-24 is prominently expressed in naive B-cells and in memory B-cells, but repressed in centroblasts [10]. In CLL B-cells, which are mostly in the G0/early G1 phase of the cell cycle, IL-24 is strongly expressed as well, and promotes cell survival [12]. Thus, in various malignant and non-malignant cells, IL-24 expression is repressed by mitotic signals. Conversely, IL-24 expression is restored or even amplified once the cells have started their differentiation process. This strongly suggests that the function of IL-24 in various tissues is not detrimental in quiescent cells, and may even help them survive, partly by blocking progression into the cell cycle.

We attempted herein to gain insight into the molecular mechanisms behind IL-24 activity. Having previously established that IL-24 inhibited the differentiation of plasma cells from germinal center B-cells, we used this *in vitro* model to analyze the effect of recombinant (r)IL-24 on the mRNA profile of activated B-cells. We arbitrarily extracted mRNAs at an early, 6 h time point, and at 36 h. These results seemed meaningful in retrospect, since several proapoptotic genes were activated after 36 h. In addition, IL-24 inhibited the expression of 10 genes involved in DNA replication within 6 h. Thus, IL-24 acted

Correspondence: Ali Dalloul, Faculté de Médecine, 9 av de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre lès Nancy, France. Tel: 33(3)83683575. E-mail: ali.dalloul@univ-lorraine.fr; ali.dalloul@u-psud.fr

Received 4 April 2012; revised 1 July 2012; accepted 26 July 2012

RIGHTSLINK

sequentially on B-cells by inducing a first wave of transcripts in order to promote cell cycle arrest and a second wave of transcripts aimed at promoting cell death.

Materials and methods

Cell isolation and culture

Human tonsils were obtained from seven children (aged 2–6 years) undergoing tonsillectomy. Briefly, tonsils were minced, the cell suspension was filtered through a 70 μm cell strainer (Becton Dickinson), and mononuclear cells were separated using Ficoll–Hypaque (GE Healthcare) density gradient. The resultant mononuclear cells were submitted to a B Cell Negative Isolation Kit (Dynal Biotech) and stained for further fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis and/or cell culture. B-cells comprised between 50 and 80% mononuclear cells and were 97–99% pure after purification as assessed by CD19 staining.

The cells of seven patients with chronic lymphocytic leukemiua (CLL; two immunoglobulin heavy chain variable gene [IgVH] mutated, three unmutated, two undetermined) were collected after informed consent and signature according to the Declaration of Helsinki and ethical bylaws of the University of Nancy Medical School. Cells from this group were processed on the bench, and B-cells separated using RosetteSep Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Purified B-cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 mg/mL), 2 mM L-glutamate and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen) at 37 °C in 5% CO_2. The following reagents were used for stimulation experiments: rIL-2 (100 ng/mL), rIL-10 (50 ng/mL), rIL-24 (100 ng/mL) and CD40-ligand trimer (200 ng/mL) (all from R&D Systems). F(ab)'$_2$ rabbit anti-human IgM (Jackson Immunosearch, Baltimore) was used at 20 μg/mL. Insulin-like growth factor 1 (IGF1) inhibitors used were: sc-205907 (SC; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), tyrphostin IGF1-specific inhibitor (ALX-270-217) and a non-selective receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor (ALX; ALX-270-362; both from Enzo Life Sciences, Famingdale, NY). The p53 inhibitor pifithrin-alpha and caspase inhibitor ZVAD-fmk were both from Calbiochem.

Monoclonal antibodies and flow cytometry

The following monoclonal antibodies (mAbs) were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD20, phycoerythrin (PE)-anti-CD38, PE-anti-IGF1R (all from BD Biosciences), peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP)/Cy5.5-anti-CD5 and PE-Cy7-anti-CD19 (Beckman Coulter). Fluorescence was analyzed using a FC500 (Beckman Coulter) system and data analyzed using CXP software.

Apoptosis

For apoptosis studies, cultured normal and CLL B-cells (1×10^6) were washed with cold 1 × phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in 1 mL of 1 × binding buffer of an annexin V–FITC kit (BD Biosciences). Cells (1×10^5) in 100 μL 1 × binding buffer were stained with 5 μL of annexin V–FITC and 5 μL of propidium iodide (PI) in the dark for 15 min at room temperature. Next, 400 μL of 1 × binding buffer was added before FACS analysis.

Mitochondrial membrane potential

An NIR Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Cells were incubated with the near-infrared (NIR) probe according to the manufacturer's instructions, and analyzed by flow cytometry using the FL4 channel.

RNA isolation and semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Cells (10^6/mL) cultured under various conditions were washed in PBS and homogenized with 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), and total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized by extension of a mix of oligo(dT) and random hexamers with SuperScript II reverse transcriptase (all from Invitrogen Life Technologies) in a mixture containing 300 ng of total RNA first digested by RNase-free DNA I (1 U/μg RNA) (Sigma) for 15 min at 37 °C. The primers and protocols used for polymerase chain reaction (PCR) are listed in Table I.

Real-time PCR

Cells (10^6/mL) cultured under various conditions were washed in 1 × PBS, resuspended in RTL lysis buffer and stored at −80° C, and RNA was purified using an RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with random hexamers using the SuperScript II first-strand synthesis system for reverse transcription (RT)-PCR (Invitrogen Life Technologies). Transcript expression was analyzed by quantitive real-time PCR using LightCycler SsoFast EvaGreen technology (Bio-Rad). Thermocycling was performed on a Mastercycler RealPlex^2 instrument (Eppendorf). The SsoFast EvaGreen super mix (Bio-Rad) was used to perform real-time PCR. After incubation at 95 °C for 2 min, 40 cycles of amplification were performed. Each cycle consisted of 15 s at 95 °C and 45 s at the corresponding melting temperature (T_m) for each couple of primers. For each sample, serial dilutions were done to determine the PCR efficiency. The oligonucleotides used for the LightCycler are listed in Table II.

Results were analyzed using using RealPlex software version 2.2 (Eppendorf). Each reaction was performed in triplicate, and results were normalized using the cycle threshold (*Ct*) of GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) or actin expression. Relative expression was calculated by measuring the difference of normalized *Ct* between condition A versus condition B and applying the following formula: difference of expression between A and B = $2^{CtA-CtB}$.

Gene arrays

Total RNA was extracted and purified from B-cells according to the RNeasy Mini Kit protocol (Qiagen,

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

Table I. Primers used for PCR amplification.

Primer	T_m (°C)	Sequence	Product length	PCR program
CDC6	60	F: GCA-CTG-GAT-GTT-TGC-AGG-AGA-GCT R: CCG-CCA-CCT-GCT-GTT-TGC-GA	331	5 min 95 °C, 30 cycles (30 s 95 °C, 30 s 60 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
CDC45L	60	F: CAC-GTT-ATA-TGC-GAC-CAA-GG R: CGG-AGG-TCA-TAC-TCA-AAG-GA	766 or 628	5 min 95 °C, 28 cycles (30 s 95 °C, 30 s 60 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
MCM10	59	F: AAT-GGC-GAG-CCC-GAC-GCA-TT R: CCG-GGG-AGA-CTT-CTC-AGG-GGA-TT	363	5 min 95 °C, 27 cycles (30 s 95 °C, 30 s 59 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
FEN1	69	F: GCG-GCT-GAA-CGT-CAG-GCC-AC R: CTT-GAG-CTG-TGG-CGG-CTT-GC	420	5 min 95 °C, 27 cycles (30 s 95 °C, 30 s 69 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
POLE2	57	F: GGG-CGC-TCT-CCG-CCT-TCA-AG R: GCC-TGT-GGG-TCC-TCT-GGT-GC	405	5 min 95 °C, 30 cycles (30 s 95 °C, 30 s 57 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
IGF1	59	F: GAC-CCT-TTG-CGG-GGC-TGA-GCT-GGT R: CTT-CTG-AGT-CTT-GGG-CAT-GTC-AGT	419	5 min 95 °C, 30 cycles (30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
Casp8	58	F: GGTGGAGCGGATTATATTCTCC R: CCAGCAGGTTCATGTCATCATC	457	5 min 95 °C, 28 cycles (30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
Bax	60	F: CTGACATGTTTTCTGACGGC R: TCAGCCCATCTTCTTCCAGA	290	5 min 95 °C, 37 cycles (30 s 95 °C, 30 s 54 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
Bid	54°c	F: AGGCCATGGACTGTGAGGTCAACA R: CCATCCCATTTCTGGCTAAGCTCC	588	5 min 95 °C, 35 cycles (30 s 95 °C, 30 s 54 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
COX6C	62	F: GTCAGGAAGGACGTTGGTGT R: ACCAGCCTTCCTCATCTCCT	262	5 min 95 °C, 37 cycles (30 s 95 °C, 30 s 54 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
COX7B	50°c	F: AATCGTCTCCAAGTTCGAAGCAT R: GCCATATCTTAATGGGTACACAG	305	5 min 95 °C, 35 cycles (30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C
Actin	58	F: CTA-CAA-TGA-GCT-GCG-TGT-GGC R: CAG-GTC-CAG-ACG-CAG-GAT-GGC	270	5 min 95 °C, 30 cycles (30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 1 min 72 °C) 10 min 72 °C

PCR, polymerase chain reaction; T_m, melting temperature.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

Valencia, CA) and hybridized with a Whole Human Genome Oligo (60-mer) expression array, using samples ($n = 4$) for each condition. For each sample, 350 ng of total RNA was reverse transcribed, linear amplified and labeled with Cy3 (one-color protocol) using Agilent's Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, according to the manufacturer's instructions. After labeling, samples were measured on a Nanodrop microarray module for labeling efficiency and quantification. Samples were then hybridized on Agilent 4×44K Whole Human Genome Gene Expression arrays (Agilent Design #014850) at 65 °C for 17 h. After washing in Gene Expression Wash Buffer, the slide was scanned with an Agilent Microarray Scanner G2565CA. Feature extraction software (version 9.5.3.1; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) was used to convert images into gene expression data. GeneSpring GX10 software (Agilent Technologies Inc.) was used to compile and analyze the data. First, normalized data (background subtracted) were filtered on expression (lower and upper cut-off 20 and 100, respectively, for 100% of signal), then on error (coefficient of variation [CV] $< 50\%$ for 100% of signal). Only genes that were two-fold differentially expressed on four arrays were scored as significant and used for analysis. The biological process and cellular component of genes were classified according to Gene Ontology categories ($p < 0.1$).

Table II. Oligonucleotides used for LightCycler.

Primer	Sequence
CDC6	F: CCAGGCACAGGCTACAATCAG R: AACAGGTTACGGTTTGGACATT
CDC45L	F: CTTGAAGTTCCCGCCTATGAAG R: GCATGGTTTGCTCCACTATCTC
MCM10	F: CAACCCCTACAGACGATTTCTC R: GGGTCCCCACAATTTGACCTC
FEN1	F: GTATTGGGCAACCTCATTCCC R: CCTTGCGTTCCTTCATGTAGT
POLE2	F: TACTCCTCCGGTGATAGGTTCT R: CTGGAATTTGCTTCCGCTTTC
IGF1	F: GGAGCTGTGATCTAAGGAGGC R: GGACAGAGCGAGCTGACTT
Casp8	F: TTTCTGCCTACAGGTTCCACT R: CCTCAATTCTGATCTGCTCACTT
Bax	F: CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG R: CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
Bid	F: CCTTGCTCCGTGATGTCTTTC R: GTAGGTGCGTAGGTTCTGGT
COX6C	F: CCAAAACCTCGGATGCGTG R: AAATCTGCGTATGCCTTCTTTCT
COX7B	F: CTTGGTCAAAAGCGCACTAAATC R: AAAATCAGGTGTACGTTTCTGGT
Actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT
GAPDH	F: CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT R: CCATGGTGTCTGAGCGATGT

Western blot

Freshly isolated B-cells (5×10^6) were stimulated with rIL-2, rIL-10 and CD40L for 3 days, washed, and incubated or not with rIL-24 for the indicated time. Cells were lysed at 4 °C for 30 min in lysis buffer [20 mM tris(hydroxymethyl) amoniomethane HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50 U/mL aprotinin, 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate] containing 1% Nonidet P-40 detergent. Proteins were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels, electrotransferred onto polyvinylidene fluoride membranes (Amersham), and blotted sequentially with anti-Casp8 mAb, anti-actin mAb and anti-α-tubulin mAb (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA) after dehybridization. Blots were revealed using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and goat anti-mouse antibodies (Bio-Rad Laboratories) and enhanced chemiluminescence detection (Millipore, Billerica, MA).

RIGHTSLINK

Results

Transcriptomic effects of IL-24 on stimulated B-cells: early cell cycle arrest is followed by late induction of mitochondrial apoptosis pathway

In a previous study we observed that rIL-24 blocked the differentiation of germinal center (GC) B-cells into plasma cells mostly by killing plasma cell precursors [10]. In this model, GC B-cells were stimulated with a cocktail of IL-2, IL-10 and CD40-ligand for 3 days followed by 4-day stimulation with IL-2 + IL-10 to induce plasma cell differentiation. The addition of IL-24 to the culture at day 4 resulted in the inhibition of both G0/G1 and G2/M peaks and the increase of sub-G1 cell numbers. To gain insight into the molecular mechanisms of IL-24-mediated cell death, we analyzed the transcriptomic profile of B-cells stimulated for 3 days with cocktail and stimulated or not with rIL-24 for 6 h and 36 h. The transcripts present only in 6 h or in 36 h stimulated cells are depicted on a Venn diagram (Figure 1). We observed an early (6 h) modification in the expression of 11 genes belonging to "DNA metabolism" according to the Gene Ontology (GO) program (Table III); among these, 10 were inhibited, whereas in contrast, IGF1 transcripts were stimulated. These data were confirmed by RT-PCR, as the expressions of CDC6, MCM10, CDC45, FEN1, POLE2 and PHB were down-regulated within 3–6 h in IL-24-stimulated samples (Figure 2, left panel). Furthermore, we observed that five "mitochondrial genes"related to apoptosis were stimulated after 36 h; these transcripts encoded the apoptosis effectors: Casp8, Bax, Bid, and cytochrome c oxidase subunits COX6C and COX7B (Table I). Altogether these data were meaningful, and gave credence to our published results on the cytostatic and proapoptotic functions of IL-24. Indeed, the functions of nine out of 10 early inhibited genes were strikingly restricted to DNA replication and repair

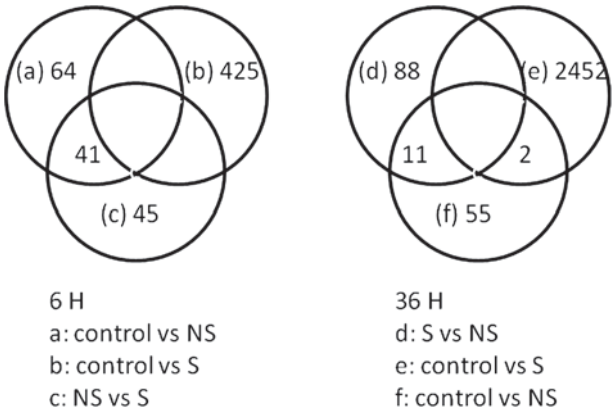


Figure 1. Venn diagram depicts genes whose expression was regulated by IL-24 in activated normal B-cells. Purified tonsil B-cells (three samples) were cultured for 3 days in IL-10 + IL-2 + CD40-ligand (control) followed by 6 h (left panel) or 36 h (right panel) culture with or without rIL-24, before mRNA extraction and hybridization with DNA chips. For each experiment, three entities [(a–c) and (d–f)] were generated and compared. NS, non-stimulated; S, IL-24-cultured. Numbers of regulated genes between two entities are shown within circles.

Table III. Genes whose expression was stimulated or inhibited > 2-fold in B-cells by IL-24.

Gene	Name	GenBank accession	Gene expression	Putative function
6H regulated genes				
CDC6	Cell division cycle 6 homolog	NM_001254	Down-regulated	Initiation of DNA replication
CDC45L	Cell division cycle 45 homolog	NM_001178010	Down-regulated	Initiation of DNA replication
DMC1	Dosage suppressor of mck-1 homolog	NM_007068	Down-regulated	Homologous recombination during meiosis
MCM4	Minichromosome maintenance complex component 4	NM_005914	Down-regulated	Replication initiation, DNA replication fork, DNA helicase
MCM10	Minichromosome maintenance complex component 10	NM_018518	Down-regulated	Replication initiation, DNA forks
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1	NM_004111	Down-regulated	DNA replication and repair
DTL	Denticeless homolog	NM_016448	Down-regulated	DNA replication and repair, cell cycle regulation
POLE2	Polymerase epsilon 2	NM_001197330	Down-regulated	DNA replication and repair, telomere maintenance, cell cycle progression
ORC1L	Origin recognition complex subunit 1	NM_001190818	Down-regulated	DNA replication, assembly of initiation factors
PHB	Prohibitin	NM_002634	Down-regulated	Mitochondrial morphology/function, transcriptional modulation
IGF1	Insulin-like growth factor 1	NM_000618	Up-regulated	Promotes cell growth, anabolism, inhibits apoptosis, decreases GH and insulin release
36H regulated genes				
Casp8	Caspase 8	NM_001080124	Up-regulated	Fas-induced AICD
Bax	BCL2-associated X protein	NM_004324	Up-regulated	Apoptotic activator of p53-mediated cell death
Bid	BH3 interacting domain death agonist	NM_001196	Up-regulated	Cleaved by casp8 to induce cytochrome c release
COX6C	Cytochrome c oxidase subunit VIc	NM_004374	Up-regulated	Catalyzes electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen
COX7b	Cytochrome c oxidase subunit VII	NM_001866	Up-regulated	Catalyzes electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen
IFI6	Interferon alpha-inducible protein 6	NM_002038	Down-regulated	Regulation of apoptosis

IL-24, interleukin-24; GH, growth hormone; AICD, activation-induced cell death.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

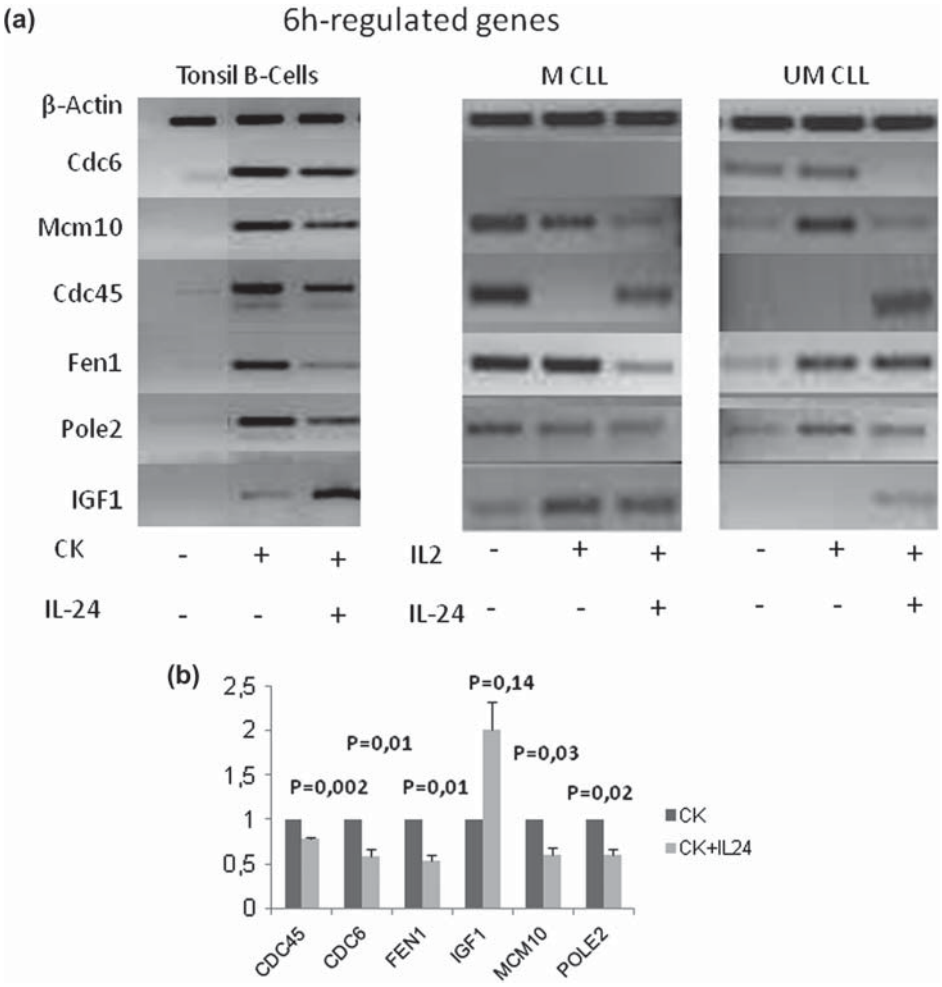


Figure 2. (a) Validation of IL-24 6 h-regulated genes by means of RT-PCR. Purified B-cells from tonsils were stimulated as in Figure 1, and CLL B-cells were incubated with IL-2 overnight followed or not by rIL-24 for 6 h before RNA purification and reverse transcription. Shown are two representative experiments from IgHV gene mutated (M) or unmutated (UM) CLL. (b) Real-time PCR was performed on three separate tonsil B-cell samples, and ratios of mRNA expression in IL-24-stimulated cells (light histograms) versus cocktail, CK (IL2 + IL10 + CD40L)-stimulated cells (arbitrary value = 1, dark histograms) were calculated for the indicated genes. Mean ± SD, *p*-values were calculated using Student's *t*-test.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

(Table III). We validated the gene array data in tonsil B-cells by RT-PCR [Figure 2(a), left] and by real-time PCR [Figure 2(b)]. Because IL-24 was cytostatic and killed the cycling fraction of IL-2-stimulated CLL cells [9], we investigated the above transcripts in CLL B-cells. As shown in two representative experiments from one IgVH-mutated (M) and one IgVH-unmutated (U) CLL, IL-24 induced the expression of IGF1, whereas the other transcripts were variably inhibited [Figure 2(a), right]. The picture was variable within CLL samples and even among U-CLL and M-CLL samples (data not shown). However, the transcripts of POLE2, MCM10, FEN1 and CDC6 were constantly inhibited, whereas those of IGF1 were constantly enhanced or induced.

By contrast with the other 6 h-modulated genes that were inhibited, IGF1 transcripts were more abundant in the 6 h IL-24-stimulated samples (Table III). This was somewhat unexpected, as IGF1 was reported to be a universal growth factor for mammalian cells including lymphocytes and lymphoid organs [13–15]. To rule out the potential contradiction between the respective effects of IGF1 and IL-24, the expression and effects of IGF1 on B-cells were therefore investigated.

Activated B-cells from tonsils and from CLL express IGF1R and become sensitive to IGF1-mediated apoptosis

We analyzed the expression of IGF1 receptor(R) on the cells of seven patients with CLL (two unmutated for the IgHV gene, three mutated and two with unknown status), and in seven tonsils. Neither B-cells from human tonsils nor CLL B-cells expressed detectable IGF1R [Figure 3(a)]. However, this receptor was induced by stimulation. We tested the activity of CD40-ligand, anti-IgM, CpGODN and SDF1/CXCL12 on B-cells, and observed that all of them induced the expression of IGF1R at the surface of normal or malignant B-cells. IGFR expression was not modified by the addition of IL-24 to the culture (data not shown). Of note, the expression of IGF1R was less inducible in CLL B-cells than in tonsil B-cells [Figure 3(a)]. Altogether, several antigen-specific or non-specific stimuli induced the expression of IGF1R and sensitized malignant and normal B-cells to the action

RIGHTSLINK

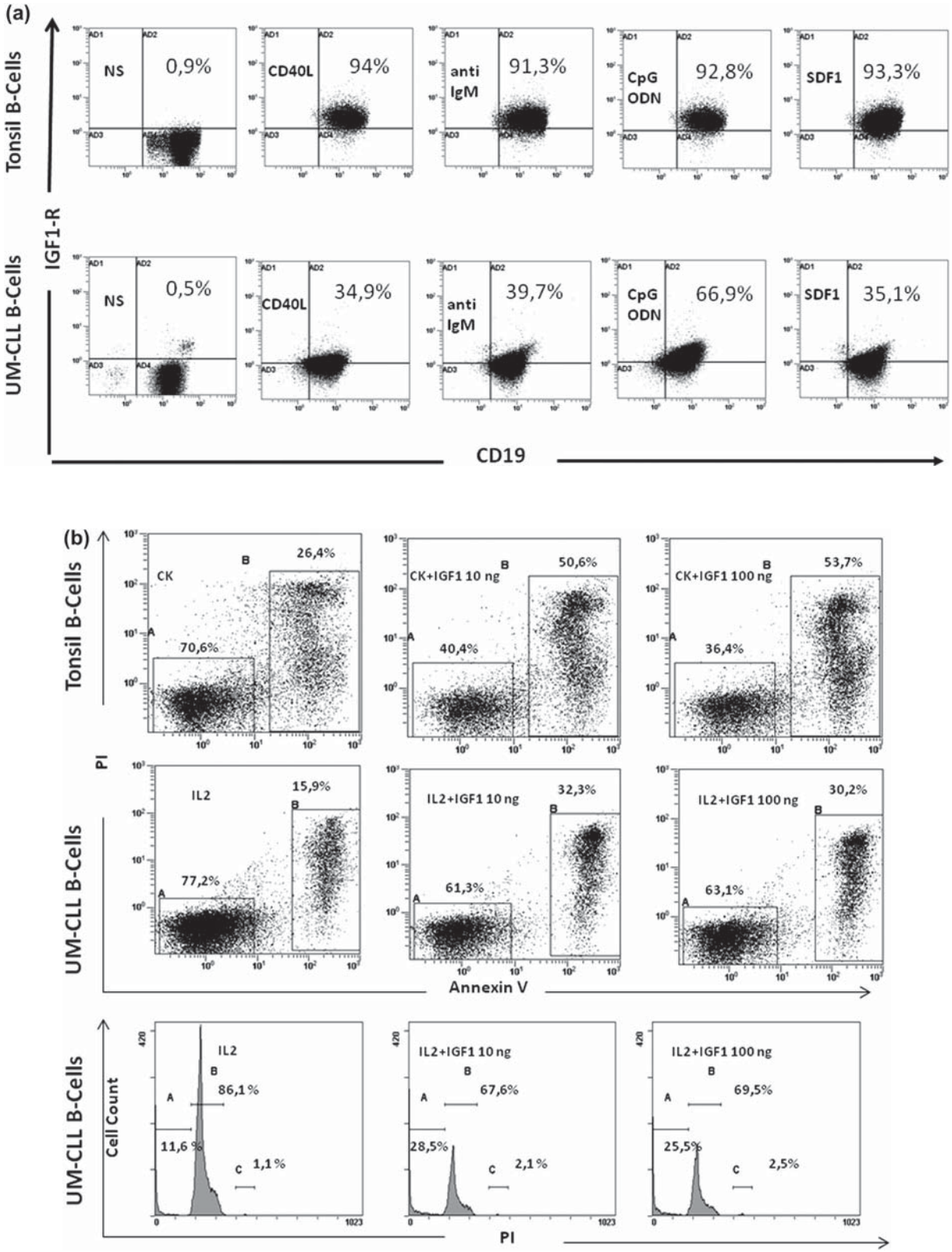


Figure 3. Effects of IGF1 on normal and CLL B-cells. (a) IGF-receptor expression was measured by flow cytometry on fresh purified B-cells after 48 h culture with the indicated stimuli (upper left on dot plots). Percentage of IGFR-positive cells is shown at upper right. (b) IGF1-mediated apoptosis was determined by annexin V–PI staining of B-cells stimulated in order with IL2 + IL10 + CD40L cocktail (CK), then by IL-24 (tonsils) or with IL-2 followed by IL-24 (CLL). Cell cycle analysis was performed on same CLL as above.

of IGF1. We next incubated tonsil B-cells with cocktail for 3 days followed by 0, 10 or 100 ng/mL IGF1 for 2 more days. CLL B-cells were incubated with IL-2 overnight followed or not by IGF1 for 2 more days. As shown by means of annexin V and propidium iodide staining [Figure 3(b)], IGF1 at 10 ng/mL was detrimental to cell survival. IGF1 diminished the percentage of cells in G0/G1 and in parallel augmented that of hypodiploid

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

cells, in the same CLL sample [Figure 3(b)]. These results are in keeping with a cytostatic effect of IGF1 on activated B-cells, and suggest that the induction of IGF1 by IL-24 is physiologically relevant.

Inhibition of the IGF1 pathway reverses several biological effects of IL-24

To investigate whether IGF1 acted downstream from IL-24 in order to promote cell death in B-cells, we activated tonsil B-cells with cytokine cocktail as above, and incubated them with various IGF1 inhibitors, at various concentrations and times, before adding rIL-24 to the culture. As shown in Figure 4(a), only one out of three tested pharmacological inhibitors, tyrphostin, was able to reverse the apoptotic effect of IL-24 (44% death under IL-24 vs. 17% death in cells incubated with tyrphostin and stimulated thereafter with IL-24). In contrast, ALX and SC inhibitors were inactive in this respect, and even were detrimental for cell survival, as shown by an enhancement of IL-24-induced cell death. Furthermore, at optimal concentration (5 μM) and incubation time (6 h), tyrphostin down-regulated the expression of COX7B, Casp8, Bax and Bid transcripts induced by IL-24, as shown by quantitative PCR (qPCR) [Figure 4(b)]. The observation that a specific IGF1 inhibitor antagonized the effect of IL-24 strongly suggested that IGF1 acted downstream of IL-24 to promote B-cell death.

IL-24 triggers the mitochondrial apoptosis pathway in activated B-cells

The results of gene array experiments showed that IL-24 modulated the expression of several genes related to cell proliferation or death in two waves. The first (6 h) wave was related to DNA metabolism, whereas the later (36 h) was related to the mitochondrial (intrinsic) apoptosis pathway as assessed by GO terms. The later transcripts were validated by RT-PCR on tonsil and CLL B-cells as shown from four representative samples on one tonsil B-cell sample, and three CLL samples with an Ig gene-mutated, unmutated or undetermined status [Figure 5(a)] and by qPCR on tonsil B-cells [Figure 5(b)]. Caspase 8 protein was investigated by Western blot and shown to be either enhanced or induced by IL-24 in normal or in CLL B-cells, respectively [Figure 5(c)]. We finally investigated the effect of IL-24 on the potential of the mitochondrial membrane as a specific indicator of intrinsic apoptosis. As shown in Figure 5(d), the mitochondrial potential evidenced by means of NIR dye fluorescence decreased significantly under IL-24.

IL-24-mediated apoptosis on B-cells is dependent on p53

We previously found that IL-24-mediated apoptosis in CLL B-cells could be prevented by incubating the cells with pifithrin-alpha, a pharmacological inhibitor of p53 transactivation [9]. In addition, IL-24 was suggested to de-repress the expression of p53 in part by inhibiting STAT3 phosphorylation on tyrosine [9,10]. We activated tonsil B-cells with cocktail, and cells were incubated or not with pifithrin-alpha, or the caspase inhibitor ZVAD-fmk, prior to culture with IL-24. As shown by annexin V–PI staining [Figure 6(a)], both pifithrin-alpha and ZVAD at 10^{-5} M were not toxic by themselves; however, they were able to antagonize the apoptotic effect of IL-24. Pifithrin-alpha also reversed the cytostatic effect of IL-24 on B-cells as shown by cell cycle analysis [Figure 6(b)]; it also antagonized IL-24 at the transcriptional level, as shown by

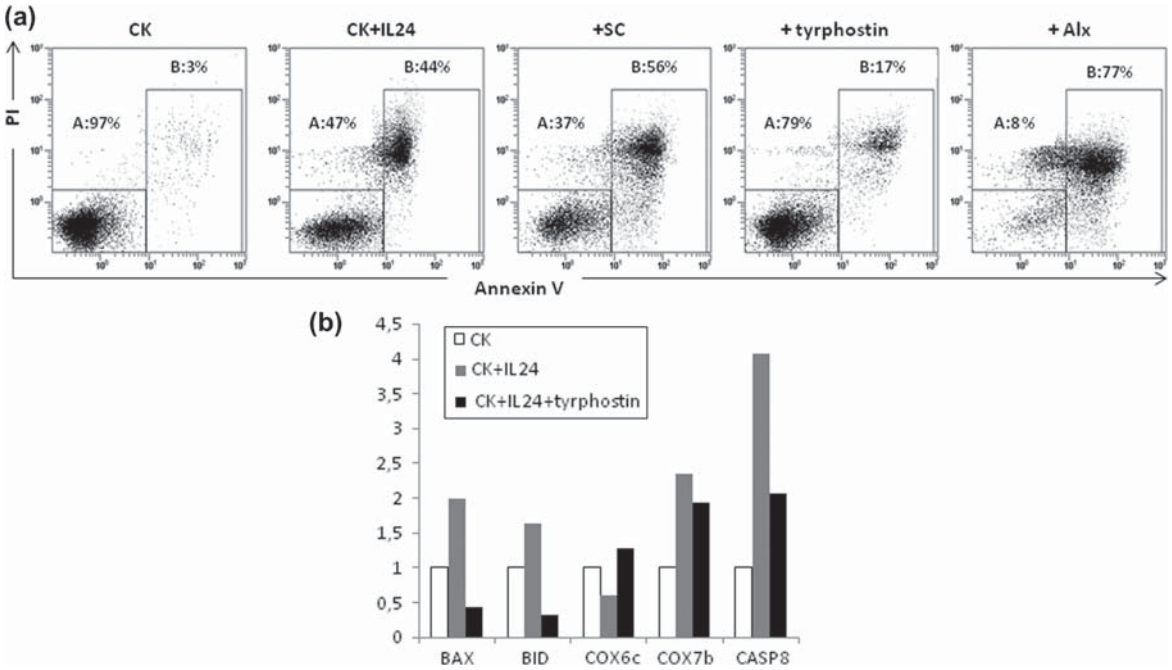


Figure 4. Inhibition of IGF1 pathway reverses biological effects of IL-24. (a) B-cells were activated with cocktail, and incubated thereafter with various IGF1 inhibitors (5 μM for 6 h) before activation with rIL-24, and annexin V–PI assay was performed 3 days later. Inhibitors: SC (sc-205907), tyrphostin (ALX-270-217), ALX (ALX-270-362). (b) Cells were incubated with tyrphostin as above before qRT-PCR at day 3 for mitochondrial pathway apoptosis genes. Histograms display relative amounts of transcripts (cocktail [CK]: white histograms, CK + IL-24: gray histograms, CK + tyrphostin + IL-24: black histograms).

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

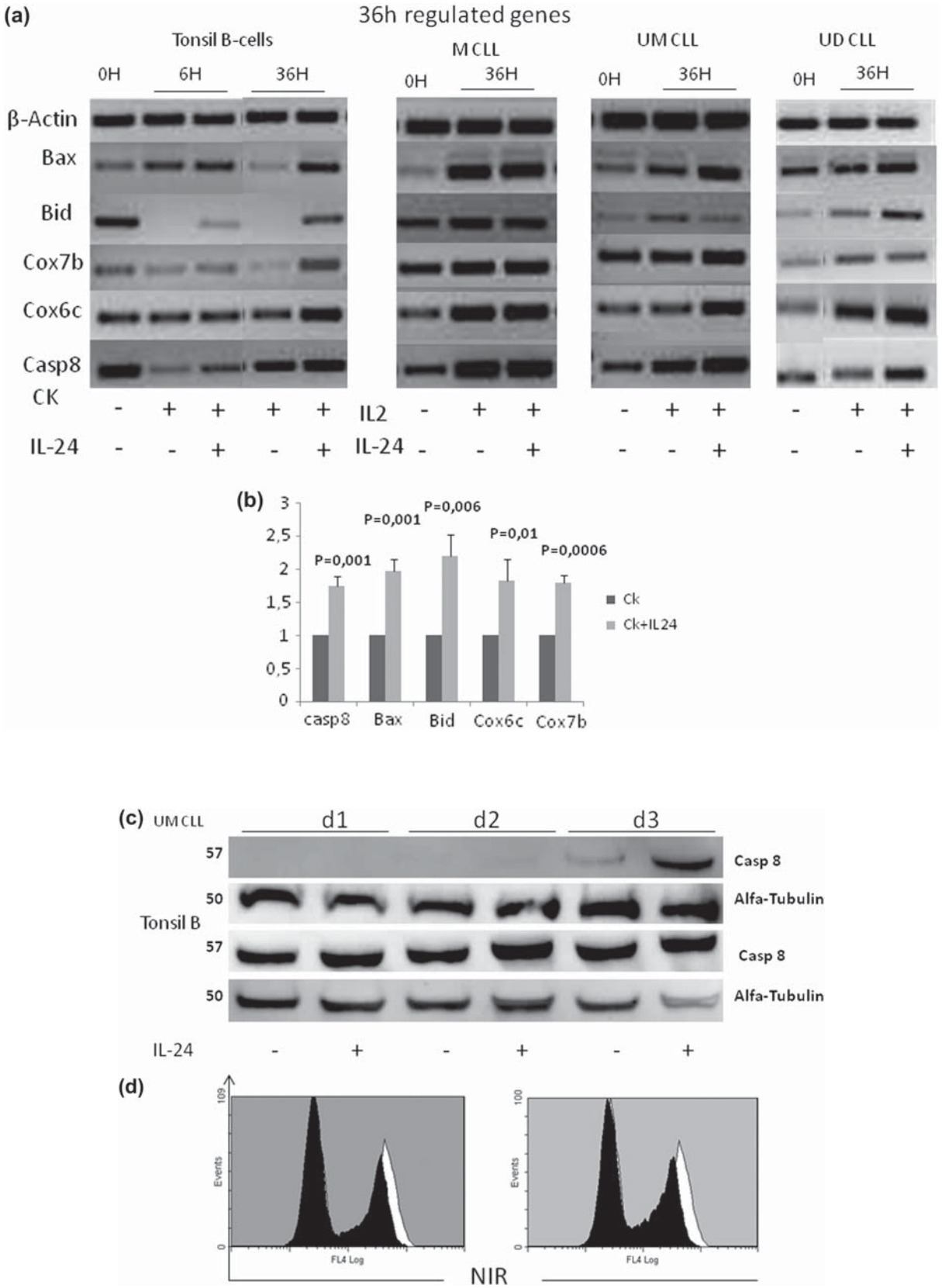


Figure 5. (a) Validation of 36 h-modulated genes by means of RT-PCR. Tonsil B-cells were cultured with cocktail (CK) whereas CLL samples (one IgVH mutated, one unmutated and one of undetermined status) were stimulated overnight with IL-2 before being stimulated with IL-24. (b) Gene expression was validated by qPCR on three tonsil B-cell samples (mean ± SD relative expression of cells stimulated or not with IL-24). (c) Casp8 protein was analyzed by Western blot under same culture conditions. (d) Mitochondrial membrane was measured in above samples by means of NIR probe and flow cytometry. Left: tonsil B-cells, right: CLL B-cells. White and black histograms: CK or IL-2 alone, and IL-24-stimulated cells, respectively.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

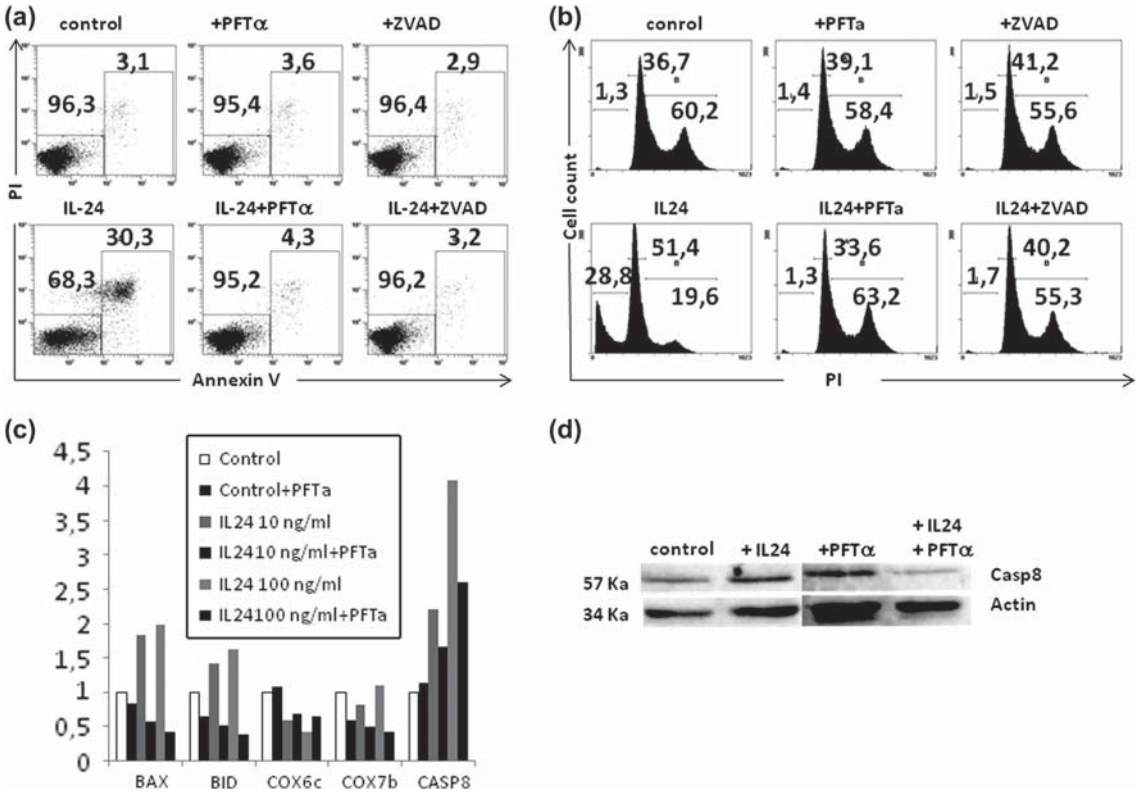


Figure 6. IL-24-mediated cell death is p53-dependent and is reversed by p53 and caspase inhibitor. (a) Tonsil B-cells were stimulated with cocktail (control) and incubated or not with pifithrin-alpha (PFTα) for h, or ZVAD-fmk, both at 10 μM, for h, then with 100 ng/mL IL-24 for 24 h, and apoptosis measured by flow cytometry (dot plots). (b) The same cells were submitted to cell cycle analysis (% of hypodiploid cells under IL-24 is shown by black icon). (c) qPCR was performed on cDNAs from same cells cultured as above. (d) Casp8 expression is shown by Western blot.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

inhibition of the genes belonging to the mitochondrial apoptosis pathway [Figure 6(c)]. Casp8 protein was analyzed by Western blot and its induction by IL-24 was antagonized by pifithrin [Figure 6(d)].

Discussion

We have described herein the molecular basis for the death-promoting effect of IL-24 on B-lymphocytes. The mechanism involves a rapid, 6 h, induction of DNA replication arrest followed by late, 36 h, induction of mitochondrial endogenous apoptosis pathway genes. Among the genes modulated during the first wave we focused on IGF1, as its transcription was enhanced, at variance with the 11 other transcripts, the expressions of which were inhibited. This was rather surprising, as IGF1/somatomedin-C is a growth hormone with positive effects on organ size, including lymphoid tissues [13–15]. Interestingly, however, a suppressive action of IGF1 on immune responses has been reported [16]. Physiological (100–1000 ng/mL) concentrations of IGF1 were indeed able to inhibit IL-2-mediated proliferation of murine splenocytes and to inhibit their production of antibodies. In retrospect, this gives credence to our previous [9,10] and present results. Note, however, that the suppressive mechanism evoked by IGF1 was not described in this work [16], whereas we clearly show here that it involved the apoptosis of B-cells. In murine models, the suppressive action of IGF1 is limited to activated mature lymphocytes, in contrast to its well-documented role in the expansion of B-cell precursors [17,18]. No such activity was reported in human B-cells, as we could not detect a sizable IGF1R-positive B-cell population, including within the CD10 + B-cells in the blood or in tonsils. We were able to expand a B-cell population *in vitro* with IGF1 (data not shown). Thus, based on our data, human B-cells become responsive to IGF1 only after activation and therefore expression of the IGF1R. IGF1 may play a role in the B-cell contraction that follows antigen-driven B-cell expansion. Whether this hormone has endocrine or autocrine effects on activated B-cells remains to be elucidated, although most cells throughout the body produce IGF1. The parameters governing the concentration and activity of IGF1 in lymphoid organs may include serum concentration, but also local production of IGF1 and IGF1-binding proteins that extend the half-life of this hormone [14].

The finding that IGF1 induced the apoptosis of IL-2- and CD40-stimulated CLL cells paralleled similar results previously described with IL-24 [9]. This effect, however, is at variance with that reported in multiple myeloma where IGF1 activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways in addition to the induction of telomerase and several antiapoptotic proteins, thereby providing protection to malignant cells [19–21]. Of note, in the study which demonstrated a suppressive effect of IGF1 on IL-2-stimulated splenocytes and on cell lines, the SP2 myeloma cell line was insensitive to IGF1 [16]. Whether IGF1, like IL-24 [10],

RIGHTSLINK

is detrimental for the survival of activated normal plasma cells remains to be determined. Altogether, IGF1 is not a growth factor for human B-cells. Of note, a recent study demonstrated that IGF1 can activate cell cycle arrest in G2M in irradiated cells [22]. Of interest, among the three pharmacological inhibitors tested, only the one that specifically inhibited the IGF1 pathway, AG1024-tyrphostin, was able to antagonize the apoptotic effect of IL-24. IGF1 is therefore a component of the IL-24-induced signaling acting downstream of this molecule to promote cell death in activated B-cells.

Our data also gave credence to our previous study which demonstrated the role of p53 as a downstream activator of IL-24-mediated cell cycle arrest and cell death [9]. Indeed, several transcripts are modulated similarly by both IL-24 and p53. GADD45A, for instance, is induced by both molecules [3,23], and blocks G2/M transition while inducing cell senescence [24]. Bax and Bak are canonical transcripts induced by p53, either directly [25,26] or indirectly induced by Puma [27], which activates caspase 8 [28]. Both Bax and Casp8 are key effectors of apoptosis, inasmuch as Casp8 cleaves and activates Bid [27,29]. Finally, p53 was shown to activate the expression of cytochrome c oxidase subunits in various cells [30,31]. This is of interest, as cancer cells preferentially utilize glycolysis over aerobic respiration, the so-called Warburg effect, which is inhibited by p53 through up-regulation of COX [32,33]. Thus, engagement of the IL-24–p53 axis compromises anaerobic respiration in malignant cells. This may explain why the effect of IL-24 on CLL B-cells was reversed by pifithrin-alpha and by ZVAD-fmk in our previous [9] and present experiments.

By contrast to the role of p53 on the mitochondrial pathway, the data on p53 and DNA replication and meta_ bolism are scarce, yet they often show that p53 regulates this family either at the transcriptional level [34] or by stabilizing the protein [35]. Physical interactions between p53 and DMC1 [36] and DTL [37] proteins have also been described. Alternatively, some of the "DNA metabolism" genes such as prohibitin have been shown to stimulate p53 transcriptional activity [38]. It is therefore likely that p53 is central in IL-24-mediated cytostatic activity and regulates a complex network of genes involved in cell cycle arrest and apoptosis. It is also inferred from these results that IL-24 may prove to be inefficient at inducing cell death in p53 deleted or mutated cells.

Acknowledgements

We thank Mélanie Durand for technical help, and the Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) and Société Française d'Hématologie for financial support. This work is part of the fulfillment of a PhD thesis of N.H.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

References

[1] Sauane M, Su Z-Z, Gupta P, et al. Autocrine regulation of mda-7/IL-24 mediates cancer-specific apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:9763–9768.

[2] Su ZZ, Madireddi MT, Lin JJ, et al. The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:14400–14406.

[3] Jiang H, Su ZZ, Lin JJ, et al. The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:9160–9166.

[4] Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation associated gene-7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. J Immunol 2002;168:6041–6046.

[5] Poindexter NJ, Walch ET, Chada S, et al. Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. J Leukoc Biol 2005;78:745–752.

[6] Kunz S, Wolk K, Witte E, et al. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. Exp Dermatol 2006;15:991–1004.

[7] Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, et al. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol 2005;174:3695–3702.

[8] He M, Liang P. IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22 and IL-24 in the epidermis. J Immunol 2010;184:1793–1798.

[9] Sainz-Perez A, Gary-Gouy H, Gaudin F, et al. IL-24 induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B-cells engaged into the cell cycle through dephosphorylation of STAT3 and stabilization of p53. J Immunol 2008;181:6051–6060.

[10] Maarof G, Bouchet-Delbos L, Gary-Gouy H, et al. Interleukin-24 inhibits the plasma cell differentiation program in human germinal center B-cells. Blood 2010;115:1718–1726.

[11] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, et al. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene mda7, modulated during human melanoma differentiation growth and progression. Oncogene 1995;11:2477–2486.

[12] Sainz-Perez A, Gary-Gouy H, et al. High MDA-7 expression promotes malignant cell survival and p38 MAP kinase activation in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2006;20:498–504.

[13] Clark R, Strasser J, McCabe S, et al. Insulin-like growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. J Clin Invest 1993;92:540–548.

[14] Heemskerk VH, Daemen MA, Buurman WA. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev 1999;10:5–14.

[15] Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, et al. Recombinant human insulin growth factor-1 stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. Proc Natl Acad Sci USA 1989;85:4889–4893.

[16] Hunt P, Jardieu P. Suppressive effects of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF1) on immune responses. J Immunol 1986; 136:3994–3999.

[17] Gibson LF, Piktel D, Landreth KS. Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. Blood 1993;82:3005–3011.

[18] Jardieu P, Clark R, Mortensen D, et al. In vivo administration of insulin-like growth factor-1 stimulates primary B lymphopoiesis and enhances lymphocyte recovery after bone marrow transplantation. J Immunol 1994;152:4320–4327.

[19] Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF-kB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells. Oncogene 2002;21:5673–5683.

[20] Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates and pathway cross-talk. Blood 2002;99:4138–4146.

[21] Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, et al. Cytokines modulate telomerase activity in a human multiple myeloma cell line. Cancer Res 2002;62:3876–3882.

[22] Mitchell G, Fillinger J, Sittadjody S, et al. IGF1 activates cell cycle arrest following irradiation by reducing binding of ΔNp63 to the p21 promoter. Cell Death Dis 2010;10:e50.

[23] Kettenhofen R, Hoppe J, Eberhard G, et al. Regulation of Gadd45a mRNA expression in vascular smooth muscle under growth and stress conditions. Cell Signal 2001;13:787–799.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

[24] Smith ML, Chen IT, Zhan Q, et al. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science 1994;266:1376–1380.
[25] Zhan Q, Fan S, Bae I, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene 1994;9:3743–3751. Erratum in Oncogene 1995;10:1259.
[26] Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. Biochem Biophys Res Commun 2003;310:956–962.
[27] Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell 2001;7:683–694.
[28] Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, et al. Essential role of caspase-8 in p53/p73-dependent apoptosis induced by etoposide in head and neck carcinoma cells. Mol Cancer 2011;10:95.
[29] Gross A, Yin XM, Wang K, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J Biol Chem 1999;274:1156–1163.
[30] Kato MV. The mechanisms of death of an erythroleukemic cell line by p53: involvement of the microtubule and mitochondria. Leuk Lymphoma 1999;33:181–186.
[31] Okamura S, Ng CC, Koyama K, et al. Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. Oncol Res 1999;11: 281–285.
[32] Assaily W, Benchimol S. Differential utilization of two ATP-generating pathways is regulated by p53. Cancer Cell 2006;10: 4–6.
[33] Matoba S, Kang JG, Patino WD, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. Science 2006;312:1650–1653.
[34] Duursma A, Agami R. p53-Dependent regulation of Cdc6 protein stability controls cellular proliferation. Mol Cell Biol 2005;25: 6937–6947.
[35] Christmann M, Tomicic MT, Origer J, et al. Fen1 is induced p53 dependently and involved in the recovery from UV-light-induced replication inhibition. Oncogene 2005;24:8304–8313.
[36] Habu T, Wakabayashi N, Yoshida K, et al. p53 Protein interacts specifically with the meiosis-specific mammalian RecA-like protein DMC1 in meiosis. Carcinogenesis 2004;25:889–893.
[37] Banks D, Wu M, Higa LA, et al. L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. Cell Cycle 2006;5: 1719–1729.
[38] Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, et al. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. J Biol Chem 2003;278:47853–47861.

Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 10/25/12
For personal use only.

RIGHTSLINK

DISCUSSION

DISCUSSION

1 IL24 et Apoptose

Ce travail s'est proposé d'analyser le rôle immunologique de l'IL-24 ainsi que ses mécanismes d'induction de mort cellulaire dans les lymphocytes B. Pour cela, j'ai utilisé deux types de LB différentes :

1. les LB normaux, provenant d'amygdales humaines qui constituent une source accessible et intéressante de lymphocytes B car ils représentent au moins 60% de l'ensemble des cellules et sont présents à tous les stades de différentiation.

2. les cellules B de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), qui est la forme de leucémie adulte la plus fréquente dans les pays occidentaux. Cette leucémie est caractérisée par l'accumulation dans le sang de lymphocytes B matures $CD5^+$. Des travaux précédents ont montré que les cellules B de LLC expriment fortement l'IL-24 (Sainz-Perez et al., 2006). On sait par ailleurs que ces cellules présentent un phénotype mémoire. Elles expriment toutes le marqueur de LB mémoire CD27. Par ailleurs, ces cellules n'ont pas la capacité de se différentier en plasmocytes, ce qui entraine souvent chez les malades atteints de LLC une hypogammaglobulinémie.

Dans le cas des lymphocytes B normaux, nous avons utilisé le modèle de différentiation mis au point par YJ Liu et J Banchereau (Arpin et al., 1995). La seule différence apportée ici a été l'utilisation d'un CD40L soluble trimérique. Dans le cas des lymphocytes B de LLC, nous avons stimulé les cellules avec l'IL-2 pendant 24h avant de les traiter par l'IL-24.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'effet apoptotique de l'IL-24 implique un arrêt précoce (6h) de la réplication d'ADN, suivi d'une induction plus tardive (36h) des gènes de la voie mitochondriale d'apoptose. Parmi les gènes régulés au cours de la première vague, nous nous sommes concentrés sur l'IGF1 car son expression était augmentée quand celle des 10 autres transcrits était inhibée. Ceci était assez surprenant si l'on tient compte du fait que l'IGF1/Somatomedin-C est connue pour être une hormone de croissance ayant des effets positifs sur la croissance des organes, y compris les tissus lymphoïdes (Clark et al., 1993; Heemskerk et al., 1999; Zapf et al., 1989). Cependant, et d'une façon intéressante, une action suppressive d'IGF1 sur les réponses immunitaires a été reportée (Hunt and Eardley, 1986). Des concentrations d'IGF1 allant de 100 à 1000 ng/ml sont en effet capables d'inhiber la

prolifération des splénocytes murins induite par l'IL-2 et d'inhiber leur production d'anticorps. Rétrospectivement, cela tend à corroborer nos résultats précédents (Sainz-Perez et al., 2008 ; Maarof et al., 2010) ainsi que les observations faites au cours de ce travail. Notons cependant que le mécanisme de suppression évoquée par l'IGF1 n'est pas décrit dans le travail de Hunt et Jardieu, alors que nous montrons clairement ici qu'il s'agissait de l'apoptose des cellules B. Dans des modèles murins, l'action suppressive de l'IGF1 est limitée aux lymphocytes matures activés contrairement à son rôle sur l'expansion des précurseurs des cellules B (Gibson et al., 1993; Jardieu et al., 1994). En revanche, aucune activité n'a été rapporté dans les lymphocytes B humains, vu que nous n'avons pas pu détecter de sous population de cellules B exprimant le récepteur à l'IGF1, y compris au sein des cellules B $CD10^+$ dans le sang ou dans les amygdales. Par contre, nous avons pu développer *in vitro* une sous population de lymphocytes B sensible à l'IGF-1. Ainsi, les lymphocytes B humains deviennent sensibles à l'IGF1 seulement après activation et donc expression de l'IGF1-R. L'IGF1 peut donc jouer un rôle dans la contraction des cellules B qui suit l'expansion de ces cellules après rencontre avec l'antigène. Reste à élucider si cette hormone possède des effets endocrine ou autocrine sur les cellules B activées, même si la plupart des cellules de l'organisme produisent de l'IGF1. Les paramètres régissant la concentration et l'activité de l'IGF1 dans les organes lymphoïdes peuvent inclure la concentration sérique, mais aussi la production locale d'IGF1 et des protéines de liaison à l'IGF1 (IGF1-binding Proteins) qui prolongent la demi-vie de cette hormone (Heemskerk et al., 1999).

La constatation que l'IGF1 induit l'apoptose des cellules B leucémiques stimulées par IL-2 et CD40-L est en accord avec des résultats similaires décrits précédemment avec l'IL-24 (Saint-Perez et al., 2008). Cet effet est cependant en contradiction avec celui rapporté dans de myélome multiple où IGF1 active les voies de signalisation PI3K et MAPK, en plus de l'induction de la télomérase et de plusieurs protéines anti-apoptotiques, offrant ainsi une protection aux cellules malignes (Akiyama et al., 2002; Mitsiades et al., 2002; Qiang et al., 2002). A noter que dans les travaux qui ont démontré l'effet suppressif de l'IGF1 sur des splénocytes stimulées par IL-2 et sur des lignées cellulaires, la lignée de cellules de myélome SP2 était insensible à l'IGF-1 (Hunt and Eardley, 1986). Il reste à déterminer si l'IGF1, comme l'IL-24 (Maarof et al., 2010), est préjudiciable à la survie des cellules plasmatiques normales activées.

Finalement, nos résultats montrent que l'IGF-1 n'est pas un facteur de croissance pour les lymphocytes B humains. Ceci est à rapprocher à une étude récente qui a démontré que l'IGF-1

peut entrainer un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules irradiées (Mitchell et al., 2010). Fait intéressant : parmi les trois inhibiteurs pharmacologiques que nous avons testé, seul celui qui inhibe spécifiquement la voie de signalisation de l'IGF1, AG1024-tyrphostine, était capable d'antagoniser l'effet apoptotique de l'IL-24. Ceci montre que l'IGF1 est bien un composant de la signalisation induite par IL-24, agissant en aval de cette molécule pour promouvoir la mort cellulaire des cellules B activées.

Nos résultats ont également corroboré une précédente étude de notre équipe qui avait démontré que p53 agit en aval de l'arrêt du cycle et la mort cellulaire induite par l'IL-24 (Saint-Perez et al., 2008). En effet, plusieurs transcrits sont modulés de façon similaire par l'IL-24 et p53. GADD45A par exemple, est induite par les deux molécules (Kettenhofen et al., 2001; Smith et al., 1994) et bloque la transition G2/M tout en induisant la sénescence cellulaire (Zhan et al., 1994). Bax et Bak sont des transcrits canoniques de l'apoptose. Ils sont induits soit directement par p53 (Liu et al., 2003; Nakano and Vousden, 2001), soit indirectement par Puma (Liu et al., 2011) qui active caspase 8 (Gross et al., 1999). Notons que Bax et casp 8 sont des effecteurs clés de l'apoptose, dans la mesure où CASP8 clive et active Bid (Kato, 1999; Liu et al., 2011).

Enfin, il a été démontré que p53 active l'expression des sous-unités du cytochrome oxydase-c (COX) dans diverses cellules (Assaily and Benchimol, 2006; Okamura et al., 1999). Ceci est intéressant car les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie pour la respiration, ce qu'on appelle « effet Warburg ». Ceci implique que la cellule cancéreuse se comporte comme si elle était en anaérobie. Cet effet est inhibé par p53 grâce à la régulation positive du COX (Duursma and Agami, 2005; Matoba et al., 2006). Ainsi, l'engagement de l'axe IL24-p53 compromet la respiration anaérobie dans les cellules malignes. Cela peut expliquer pourquoi l'effet de l'IL-24 sur les cellules B de LLC a été inversé par pifithrin alpha et par zVAD-fmk dans nos précédentes (Sainz-Perez et al., 2008) et actuelles expériences (figure 42, page suivante). Signalons que notre équipe, en collaboration avec un groupe Canadien, a montré un tel effet dans les cellules de LLC (Spaner et al., 2012).

S'il est bien établi aujourd'hui que p53 joue un rôle sur la voie mitochondriale, peu de données expliquent comment p53 régule la réplication d'ADN ainsi que le métabolisme de cette voie. Certains travaux montrent que p53 régule cette famille soit au niveau transcriptionnel (Christmann et al., 2005) soit en stabilisant la protéine (Habu et al., 2004). Des interactions physiques entre p53, les protéines DMC1 et DTL (Higa et al., 2006) ont

également été décrites. Par ailleurs, certains gènes du « métabolisme d'ADN» tels que prohibitine (PHB) ont été décrits pour stimuler l'activité transcriptionnelle de p53 (Fusaro et al., 2003). Il est donc probable que la protéine p53 soit un élément central dans l'activité cytostatique induite par l'IL-24 et régule un réseau complexe de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ces résultats suggèrent également que l'IL-24 serait inefficace pour induire la mort cellulaire dans les cellules délétées ou mutées pour p53.

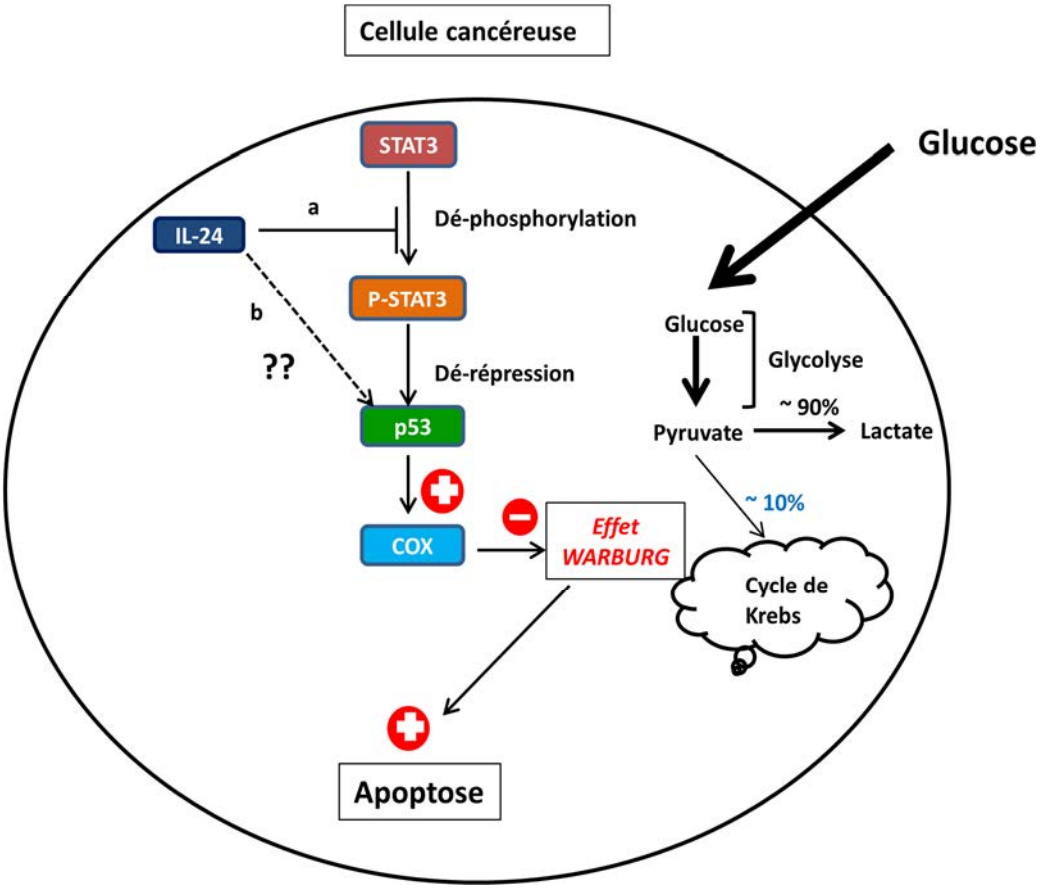


Figure 42 : représentation schématique de l'effet de l'IL-24 sur l'apoptose, passant indirectement par p53 dans une cellule leucémique. IL-24 déréprime p53 soit en déphosphorylant STAT3 sur tyrosine (LLC) soit par une autre voie (résultats en cours). Ceci active la transcription du gène COX qui à son tour inhibe l'effet WARBURG provoquant ainsi l'apoptose de la cellule.

2 Expression et induction de Mda-7/IL-24 dans les cellules immunitaires

L'expression de l'IL-24 est détectée par Western Blot dans les PBMC activés par du LPS (lipopolysaccharide) ou de la PHA (activateur polyclonal de la phytohémagglutinine)

(Caudell et al., 2002). Dans cette étude, l'IL-24 est détectée par marquage immunohistochimique dans les cellules $CD19^+$ et les cellules $CD56^+$, mais est absente dans les cellules T ou les monocytes. En revanche, des études par PCR en temps réel ou marquage intracellulaire ont montré que le profil d'expression de Mda-7/IL-24 est très semblable à celui de l'IL-10 (Nagalakshmi et al., 2004; Poindexter et al., 2005; Wolk et al., 2002). Les auteurs montrent que Mda-7/IL-24 est exprimée par les monocytes humains activés avec du LPS seul ou avec de l'IFNγ, ainsi que par les lymphocytes T ou les PBMC activés par un anti-CD3 et un anti-CD28, mais présente dans seulement environ 15% des lymphocytes B et des cellules NK. Dans les monocytes activés par du LPS, l'expression de Mda-7/IL-24 est inhibée par l'IL-10. Il est intéressant de constater que l'expression de Mda-7/IL-24 dans les PBMC de sujets sains est fortement induite après activation par l'IL-2, IL-7 ou IL-15 (Poindexter et al., 2005), trois cytokines qui signalisent à travers la même chaîne commune γc de leur récepteur (Noguchi et al., 2008). Or, les cellules de LLC expriment la chaîne commune γc à leur surface. On peut émettre l'hypothèse que l'activation chronique *in vivo* de ces cellules par une de ces trois cytokines peut être responsable de la forte expression de Mda-7/IL-24 et contribuer à la survie des cellules de LLC.

L'IL-1β, le TNF-α ou le GM-CSF induit également l'expression de Mda-7/IL-24 dans les PBMC humains (Poindexter et al., 2005). Il est intéressant de noter que ces cytokines sont abondamment produites par les cellules de la peau. Dans tous les cas, la protéine intracellulaire est détectée dans les cellules T ou les macrophages. En revanche aucune induction d'expression de Mda-7/IL-24 n'est observée en présence de l'IL-4, l'IFN-α, IFN-β ou IFN-γ.

Si on incube les PBMC avec des anticorps dirigés contre les chaînes du récepteur à l'IL-2 avant l'activation par la PHA, on observe une inhibition de l'induction de Mda-7/IL-24 (Poindexter et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'induction d'expression de Mda-7/IL-24 dans les PBMC après activation est indirecte et due en grande partie à une stimulation de ces cellules par les cytokines produites lors de l'activation.

D'après ces données, nous constatons que les cellules du système immunitaire sont d'importants producteurs d'IL-24. Cependant, il y a peu d'études des voies de signalisation et des facteurs de transcription qui induisent l'expression d'IL-24 dans les cellules immunitaires. Schaefer et al., ont identifiée pour la première fois l'IL-24 dans les lymphocytes T $CD4^+$ de souris et l'ont désignée comme FISP (IL-4 induced secreted protein), qui est sélectivement

exprimée et sécrétée par les cellules Th2. Des niveaux détectables d'IL-24 (FISP) sont observés seulement 3 jours après le début de la différenciation Th2 et son expression nécessite au moins deux signaux : voie de signalisation TCR impliquant la protéine kinase C (PKC) et voie de signalisation de l'IL-4R qui est STAT6 dépendante (Schaefer et al., 2001). Cependant, chez l'homme, l'expression d'IL-24 dans les cellules T semble être régulée différemment que chez la souris. En effet, à courte durée (6h), son expression est inhibée dans un contexte Th1 et faiblement augmentée dans un contexte Th2. Un effet inverse est observé à longue durée (66h) (Wolk et al., 2002). Plus récemment, les travaux de Poindexter et al., suggèrent que l'IL-24 semble être exprimée par les cellules Th1 et induite par IL-2, IL-7, IL-15,TNF-α, IL-1β et GM-CSF (Poindexter et al., 2005). Par contre, une étude menée par Chan et al montre que l'IL-23 induit l'expression de l'IL-19 et l'IL-24 dans la peau chez la souris et ceci dans un modèle de psoriasis (Chan et al., 2006). L'expression de ces deux gènes (IL-19 et IL-24) est élevée en cas de psoriasis chez l'homme. Etant donné que l'IL-23 est la cytokine indispensable à la polarisation des cellules Th0 en Th17, ceci suggère que l'induction de l'IL-24 pourrait être de type Th17. Ces résultats vont dans le même sens que nos résultats non publiés qui suggèrent que l'induction de l'IL-24 par les cellules B activées avec anti-IgM plus CD40L est biphasique : à j1 cette expression est augmentée dans un contexte Th2 et Th17, par contre à j5 elle est plutôt augmentée dans un contexte Th1 et Th17, et significativement inhibée dans un contexte Th2 (Résultats, figure 30).

Globalement, nous pouvons constater que les résultats concernant l'expression et l'induction de Mda-7/IL-24 dans les cellules du système immunitaire présentent des incohérences selon les études. Ainsi, les travaux de Wang et al., montrent que les cellules de PBMC ne produisent pas de Mda-7/IL-24 après activation par du LPS mais après activation par la Concanavaline A (Wang et al., 2002). Ces différentes études emploient des techniques et des protocoles très différents et ne nous permettent pas de définir aujourd'hui quelles sont les cellules qui produisent Mda-7/IL-24 de manière constitutive ou dans quelles conditions. Une étude plus extensive en utilisant diverses approches expérimentales doit être réalisée.

3 Effet de l'IL-24 sur les cellules immunitaires

L'IL-24 est capable d'induire la production d'IL-6, TNF-α et IFN-γ par les cellules de PBMC, ainsi que IL-1β, IL-12 et GM-CSF à un plus faible niveau. L'induction de la production de ces cytokines pro-inflammatoires par l'IL-24 est partiellement ou complètement inhibée par l'IL-10 (Caudell et al., 2002 ; Wang et al., 2002). Ces observations

soulèvent la question du profil d'expression des récepteurs à l'IL-24. Quelles sont les cellules et les tissus de l'organisme sensibles à l'action de l'IL-24 ?

4 IL24 et lymphocytes B

Dans la littérature, très peu d'études montrent que les lymphocytes B expriment l'IL-24 (Wolk et al., 2002), et parmi celles-ci, aucune n'identifie les sous-populations l'exprimant. Récemment notre équipe a pu démontrer par tri cellulaire des sous populations B suivi d'une PCR en temps réel que les cellules B $CD5^+$ exprimaient fortement Mda-7/IL-24 en comparaison avec les cellules B CD5- (Maarof et al., 2010). Ils ont également montré, avec le marquage IgD, CD44, CD27 et CD38 que l'expression de Mda-7/IL-24 était présente dans les cellules B naïves (IgD^+ $CD44^+$) et qu'il est accru dans les centrocytes (IgD^- $CD44^+$) et quasiment absent dans les centroblastes (IgD^- $CD44^-$) ainsi que dans les plasmocytes ($CD27^+$ $CD38^{high}$). En revanche, cette expression est prédominante dans les lymphocytes B mémoires ($CD27^+$ $CD38^-$). Maarof et al ont pu également visualiser l'expression de l'IL-24 *in vivo* dans les cellules B des tissus lymphoïdes secondaires à l'aide d'une coloration par immunofluorescence effectuée sur des sections congelées d'amygdales humaines avec l'anti-CD20 et anti-IL-24. Les résultats ont montré la présence de cellules B doublement marquées ($CD20^+$, IL-24^+) dans les follicules généralement situées à la périphérie des follicules secondaires, immédiatement adjacentes à la zone périfolliculaire des cellules T où l'on note également la présence de nombreux lymphocytes T exprimant l'IL-24. Fait à noter, très peu de cellules B exprimant l'IL-24 ont été trouvées dans la zone sombre du centre germinatif, dans le centre de la zone claire, dans le paracortex riche en lymphocytes T et dans les cordons médullaires.

Nos résultats obtenus avec les biopuces à ADN montrent pour la première fois que l'IL-24 inhibe l'expression des gènes de la synapse immunologique (CD3ε, CD8α, CD8β, ZAP-70 et LAT) (résultats non publiés). Ainsi, selon nos résultats, et en tenant compte de la localisation de la sous population B (B $CD5^+$) exprimant l'IL-24 (Zone de contact B-T), un rôle potentiel à l'IL-24 dans la régulation de la réponse immune pourrait être attribué. Mais il reste également à déterminer quels sont les facteurs qui induisent l'expression de l'IL-24 dans la sous population B $CD5^+$ du manteau. Maroof et al ont suggéré qu'une combinaison de stimulation CD40 et du BCR pourrait optimiser l'induction de l'IL-24 par les cellules B du centre germinatif (Maarof et al., 2010). Notons que les cellules B $CD5^+$ sont localisées aussi bien dans le manteau que dans la zone sous épithéliale des amygdales, et que lors des travaux

de Maarof et al, ce sont les cellules B $CD5^+$ du manteau et les autres cellules B $CD5^+$ qui ont été analysées. Ceci nécessiterait d'autres travaux afin de préciser quelles cellules B $CD5^+$ expriment l'IL-24.

5 IL24 et plasmocytes à vie courte

Chez l'homme ainsi que chez la souris, l'activation des cellules B naïves et leur différentiation en plasmocytes se font de deux manières :

1) différentiation plasmocytaire T-dépendante donnant naissance à des plasmocytes de longue durée de vie. Ceci nécessite l'engagement du BCR et l'intervention de cellules T via CD40L et IL-10, aboutissant à la formation des centres germinatifs et des cellules B mémoires. Les cellules B mise en cause sont plutôt des cellules B2 ou cellules B folliculaires (FO).

2) différentiation plasmocytaire T-indépendante donnant naissance à des plasmocytes de courte durée de vie. Ce phénomène se fait indépendamment des cellules T et du BCR. Il fait intervenir d'autres cellules, comme les cellules dendritiques myéloïdes (DC) (Balázs et al., 2002; Litinskiy et al., 2002; MacLennan and Vinuesa, 2002) et les cellules dendritique plasmacytoïdes (pDC) (Jego et al., 2003).

Chez la souris, il a été démontré que l'activation de la plupart des TLR aboutit à la différentiation des cellules B1a et B MZ en plasmocytes de courte durée de vie (Genestier et al., 2007). Chez l'homme, et dans le cadre d'une réponse antivirale, les cellules pDC induisent la différentiation plasmocytaire des cellules B de PBMC en plasmocytes de courte durée de vie et ceci par l'intervention séquentielle de l'IFNα et de l'IL-6 (Jego et al., 2003). Notre équipe a démontré que l'IL-24 inhibe la différentiation plasmocytaire dans une réponse T-dépendante (Maarof et al., 2010). Quel est, entre autres, le rôle de l'IL-24 dans la différentiation des plasmocytes à courte durée de vie produits au cours d'une réaction extra-folliculaire (surtout dans des modèles murins) T-indépendante dans le cadre d'une réponse antibactérienne ou antivirale ? Dans ce contexte, l'interaction possible de l'IL-24 avec les voies de signalisation de l'IFNα et/ou IL-6, ainsi que son rôle par rapport aux autres membres de la famille de l'IL-10 (effet synergique versus antagoniste ?) reste à définir tout comme l'impact de l'IL-24 sur les fonctions (système immunitaire innée et adaptatif) des autres types de cellules du système immunitaire.

Signalons que ce sont surtout les cellules B humaines du manteau (B CD5^{+}) qui expriment l'IL-24 *in vivo* (résultats sur coupes de tissu) (Maaroof et al., 2010). Par ailleurs, les cellules de PBMC humaines stimulées par l'IL-24 purifié à partir du surnageant d'une lignée de cellules 293 produisent de l'IL-6 (Caudell et al., 2002). Ceci suggère un rôle potentiel de l'IL-24 dans la différentiation de plasmocytes à vie courte et surtout au stade plasmablastes-plasmocytes.

6 IL24 et lymphocytes B mémoires

Maarof et al ont démontré que l'IL-24 inhibe la différentiation plasmocytaire. Par contre, elle sensibilise les cellules à la prolifération induite par CD40L (Maaroof et al., 2010). Etant donné que les cellules B mémoires, mais pas les plasmocytes, répondent à une stimulation par CD40L, cela suggère que l'IL-24 redirige la différentiation des cellules B du centre germinatif vers la voie mémoire. Cette voie pourrait être « passive » si l'IL-24 « ferme les portes » de différentiation plasmocytaire laissant seule la voie B mémoire disponible. Mais elle pourrait également être un choix « actif » en améliorant la réactivité des cellules B à la maturation induite par CD40L. En effet, cette hypothèse a été prise en compte pendant nos travaux. Mais des résultats non publiés montrent que l'IL-24 n'a pas un effet sur l'induction de l'AID, enzyme clé dans la différentiation B mémoire (figure 43). Ceci suggère que les cellules B du centre germinatif seraient plutôt obligées, par un choix passif, d'emprunter la voie mémoire, vu que la voie plasmocytaire est bloquée par l'IL-24.

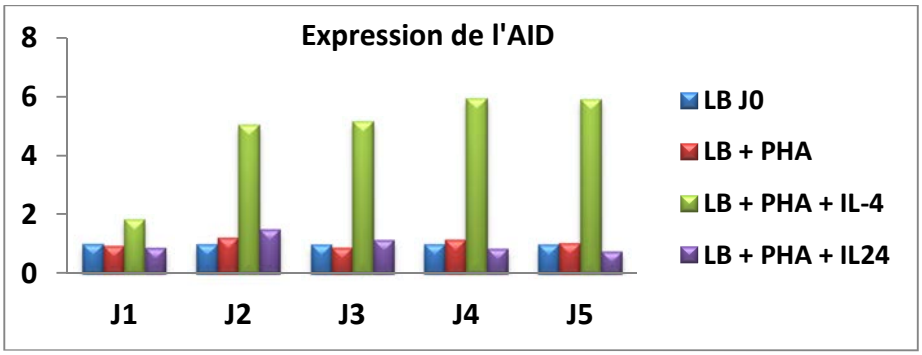


Figure 43 : Analyse de l'expression de l'AID par q-PCR. L'IL-4 a été utilisé comme contrôle positif d'expression d'AID et trois concentrations d'IL-24 ont été testées (50, 100 et 200 ng/ml).

7 Aspect controversé de l'expression de l'IL-24R dans les LB

Notre travail sur les résultats de l'IL-24 implique que l'un des récepteurs de l'IL-24 soit exprimé par les lymphocytes B. ceci a été démontré par notre équipe (Maarof et al., 2010) et confirmé au cours de ce travail (voir chapitre résultats, figures 32-35) dans les lymphocytes B d'amygdales ainsi que ceux de PBMC, mais également dans les cellules B DAUDI (résultats non publiés). Nos résultats ont été comparés avec un contrôle positif : la lignée de thymome murin BW5147 sauvage ou bien transfectée par deux chaines, IL-20Rα et IL-20Rβ (hétérodimère IL-24R1), gracieusement fournie par J-C Renauld (Dumoutier et al., 2001). Par ailleurs, l'expression de l'IL-22Rα1 est positive dans les cellules B de PBMC non stimulées et faiblement induite suite à l'activation des cellules totales d'amygdales par LPS. Ceci semble être en contradiction avec les résultats obtenus par LECRON et al., et WOLK et al., (Boniface et al., 2005; Lécart et al., 2002; Wolk et al., 2004), qui ont montré que l'expression de l'IL-22Rα1 est limitée aux cellules non hématopoïétiques. Cette contradiction est peut être due à la différence de téchniques utilisées. En effet, LECRON et al., et WOLK et al. ont limité leur analyse à l'expression des transcrits de l'IL-22Rα1 par RT-PCR sans étudier leur expression membranaire comme nous l'avons fait au cours de ce travail par cytométrie en flux.

Enfin, la question posée est de confirmer si les récepteurs « conventionnels » de l'IL-24 sont bien exprimés sur les cellules B, ou si l'IL-24 agit également par l'intermédiaire d'un autre récepteur inconnu, ou encore interagit avec un autre récepteur de cette famille de cytokines. Une telle interaction serait de faible affinité à concentrations élevées, de l'ordre de 100 ng/ml d'IL-24 telles que nous les avons utilisées. Cependant, des résultats non publiés sur les cellules B montrent que l'IL-10 mais pas l'IL-22 a des effets antagonistes sur l'apoptose induite par l'IL-24. Ceci suggère donc fortement que l'effet de l'IL-24 est bien spécifique sur les lymphocytes B.

8 Rôle de l'IL-24 dans le système immunitaire

Le rôle physiologique joué par Mda-7/IL-24 dans la réponse immune est longtemps resté inconnu. C'est en 2010 que He et al., ont mis au point une lignée de souris transgéniques dans laquelle l'IL-24 est placée sous le contrôle du promoteur de la kératine 5. Ceci permet une expression épidermique de l'IL-24. Cette souris présente de nombreux phénotypes similaires a ceux observés chez des souris transgéniques IL-20 et IL-22, y compris une mortalité

néonatale, une hyperplasie de l'épiderme et une anomalie de la différentiation des kératinocytes. Ces résultats confirment le rôle largement redondant des fonctions épidermiques de l'IL-20, IL-22 et IL-24, qui semble être l'IL-22R1 dépendante. De plus, ils ont montré que les souris transgéniques IL-24 présentent une infiltration des macrophages dans le derme de façon concomittante à une augmentation de la production de MCP-1/CCL2 à la fois par les kératinocytes de l'épiderme et les kératinocytes des infiltrats leucocytaires dans la couche adjacente cutanée ci-dessous (He and Liang, 2010).

9 Effet antiviral potentiel de l'IL-24

Nos résultats montrent pour la première fois que l'IL-24 inhibe l'expression des gènes du « métabolisme de l'ADN », tel que défini par le programme « G0 », les cellules B activées. Il est possible que l'IL-24 soit efficace pour ralentir le développement des virus à ADN (exemple : famille Herpes). Cependant, l'IL24 peut-elle bloquer la réplication des virus à ARN ?

A l'appui de cette hypothèse, l'expression de Mda-7/IL-24 est induite dans les monocytes humains pré-cultivés après infection par le virus de la grippe A (A/PR/8) (Garn et al., 2002). Cette expression est à mettre en parallèle avec celle d'autres cytokines comme IL-1, IL-6, TNF-α et des chimiokines d'attraction des monocytes (MIP-1, MCP-1 et RANTES) qui ont également été décrites pour être induites par une infection du virus de la grippe dans des conditions comparables (Peschke et al., 1993; Sprenger et al., 1996). Ceci suggèrerait un rôle de Mda-7/IL-24 dans la réponse immune antivirale (Garn et al., 2002). En revanche, nos résultats montrent une inhibition des transcrits de CD8α et β ainsi que de CD3ε et LAT, gènes impliqués dans la synapse immunologique et la réponse T (résultats non publiés). Ceci suggère une inhibition des cellules T cytotoxiques, ce qui est contradictoire avec le rôle antiviral potentiel de l'IL-24 suggéré par Garn et al. Cette contradiction est peut être compensé par une activation des cellules NK, étant donné que nos résultats montrent que l'IL-24 inhibe fortement les gènes KIR2DL4, CD244 et NCR1. Ces derniers codent pour des protéines transmembranaires exprimées à la surface des cellules NK et reliées par leurs domaines cytoplasmiques à un motif ITIM (Immune Tyrosine-based Inhibitory Motif) qui transduisent un signal inhibiteur de l'activité cytolytique des cellules NK. Donc l'IL-24 activerait les cellules NK.

Nos résultats ont également montré une inhibition des transcrit de CCR5 (récepteur de CCL3, CCL4, CCL5 et un corécepteur majeur du virus HIV) ainsi que de CCL5/RANTES (chimioattractant des cellules immunitaires : monocytes, Th et éosinophiles). Ces gènes codent pour des chimiokines favorisant l'entrée du virus HIV dans la cellule hôte. Ceci suggère que l'IL-24 pourrait inhiber l'entrée de certains pathogènes dans la cellule hôte et inhiber la réplication virale. Par ailleurs, la forte activation par l'IL-24 de CXCL9/MIG, une monokine induite par l'IFNγ et qui attire *in situ* les cellules productrices d'IFNα, suggère aussi le rôle antiviral potentiel de cette cytokine. En revanche, l'inhibition du gène CSF2/GM-CSF pourrait signifier que l'IL-24 inhibe spécifiquement certaines fonctions des monocytes (réponse au LPS) ou bien les fonctions des polynucléaires neutrophiles.

Enfin, certains de nos résultats étudiant l'effet de l'IL-24 sur l'expression des gènes qui codent pour des chimiokines (surtout CCL5) sont en contradiction avec ceux obtenus par He et Liang (He and Liang, 2010) montrant que l'IL-24 induit la production de chimiokines (surtout MCP-1/CCL2). Ce dernier est un chimioattractant des monocytes. Par contre, nous avons montré que l'IL-24 inhibe l'expression de transcrit de CCL5. Cette différence entre nos résultats et ceux de He et al, pourrait être due à la différence de modèle utilisé. He et al, ont utilisé un modèle murin, par contre, nous avons utilisé un modèle humain. Une deuxième raison pourrait dépendre des cellules utilisées comme sources de l'IL-24 (kératinocytes pour He et al contre lymphocytes B dans notre modèle).

10 IL-24 et autres cytokines de la famille de l'IL-10

L'IL-24 est un membre de la famille de l'IL-10 et en tant que tel, l'étude de son rôle dans l'organisme est indissociable de son interaction avec les autres membres de la famille de l'IL-10. Etant donné que l'IL-24 partage souvent les mêmes chaînes de récepteurs avec les membres de la famille de l'IL-10 (Parrish-Novak et al., 2002) et met en route le même processus de signalisation (Dumoutier et al., 2001), elle peut donc entrer en compétition avec d'autres membres tels que IL-19, IL-20 et IL-22 et antagoniser leur effet.

Le cas du psoriasis représente un bon modèle. Dans les lésions psoriasiques l'IL-19 et l'IL-20 sont exprimées au niveau de l'épiderme. Alors que par histochimie on a montré que l'IL-24 est exprimée dans les cellules mononuclées de l'infiltrat au niveau du derme (Rømer et al., 2003). Il est très probable que l'équilibre de production entre ces différentes cytokines ait un impact sur le développement de cette pathologie. Un traitement par rayons UV est souvent

prescrit et à pour objectif d'apaiser les symptômes de la maladie. Nous savons qu'une exposition aux rayons UV provoque des altérations du génome conduisant à l'activation de la voie de stress cellulaire p38 MAPK. Mda-7/IL-24 pourrait très bien jouer un rôle de régulateur négatif de la réponse immune dans cette pathologie via l'activation de cette voie. Il serait intéressant d'analyser l'expression de Mda-7/IL-24 dans les kératinocytes et les monocytes de patients atteints de psoriasis avant et après traitement.

L'équipe de Lecron et al, a montré que l'IL-22 est un facteur clé de l'activation et de la migration des kératinocytes. Elle induit la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires, et diminue l'expression des gènes associés à la différentiation des kératinocytes. Cette étude met également en évidence une augmentation de l'expression de l'IL-22 dans la peau de sujets psoriasiques, suivie d'une hyperplasie de l'épiderme (Boniface et al., 2005). Ces résultats semblent concordants avec les résultats obtenus par He et al dans un modèle d'une souris transgénique IL-24 au niveau de la peau. Ainsi, l'IL-24 jouerait un rôle synergique avec l'IL-22 dans un modèle de psoriasis. L'IL-24 pourrait également inhiber la prolifération des kératinocytes induite par IL-22 (effet feedback) (figure 44).

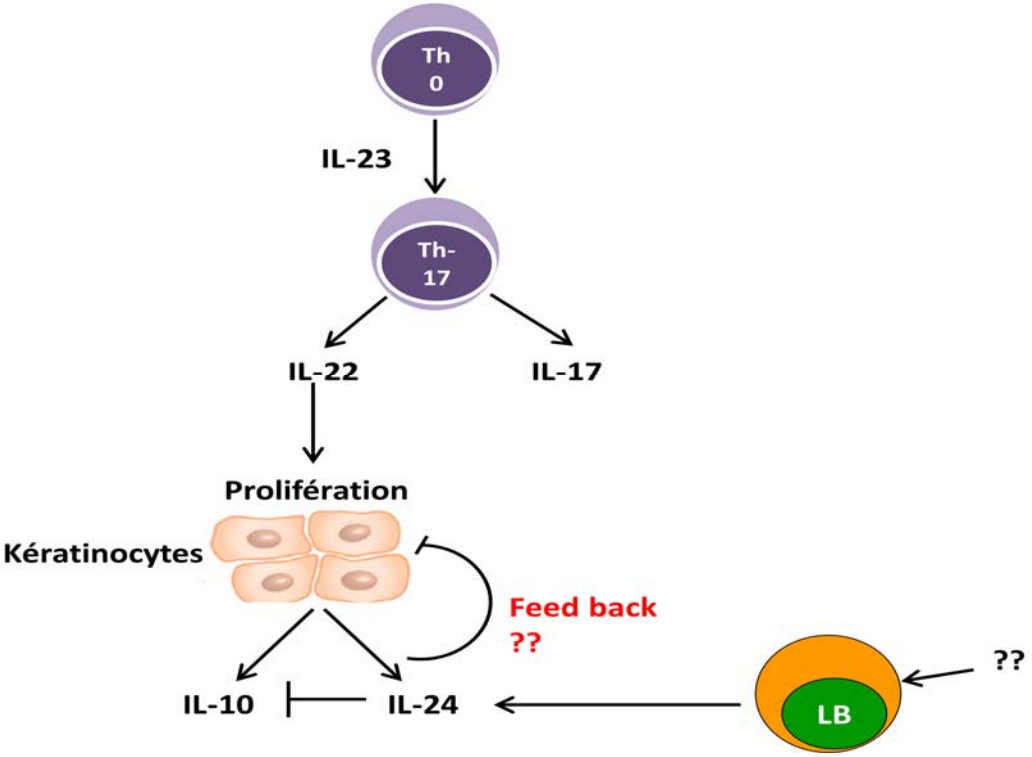


Figure 44 : Représentation schématique de l'effet synergique possible de l'IL-24 sur la prolifération des kératinocytes.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

1 Mécanisme d'action de l'IL-24

Dans ce travail, nous avons mis en évidence pour la première fois un nouveau mode d'action de l'Il-24 au niveau moléculaire. Ce mécanisme complète nos résultats précédents. Il démontre que l'IL-24 a un rôle pro-apoptotique dans les cellules lymphoïdes activées au préalable.

Nos perspectives sont de démontrer si ce mécanisme est général (dans des cellules non lymphoïdes également). Dans ce but, nous développons actuellement un modèle de lignées épithéliales (Mda7, SCOV et OVCAR) dérivées, respectivement, de cancer du sein, de la prostate et de l'ovaire ainsi dans dans des lignées lymphoïde (lignée Daudi) et myéloïde (lignée K562) experimant l'IL-24 sous contrôle d'un promoteur conditionnel. Ces expériences nous diront si l'activation préalable par un facteur de croissance, combiné à l'effet secondaire de l'IL-24, est une option pour entrainer l'apoptose de ces cellules.

Le fait que la réactivation de p53 dans des tumeurs *in vivo* entraine leur régression va dans le sens de cette hypothèse (Ventura et al., 2007). En effet nous avons auparavant montré que l'IL-24 déréprime p53 et stabilise cette protéine dans des cellules de LLC.

2 IL-24 et immunité

2.1. IL-24 et la réponse B T-dépendante

Notre équipe à démontré que l'IL-24 est exprimée dans les cellules B de type mémoire, normales et pathologiques (LLC). Le mécanisme de cette expression fait suite à une co-stimulation par anti-IgM et CD40L de cinq jours, ce qui évoque une stimulation T-dépendante et une coopération T-B efficace de type « cognate ». Il reste à définir quel(s) type(s) d'interactions T/B (systèmes récepteurs-ligands de surface, molécules solubles…), en dehors du signal CD40, a un impact clair sur la régulation de cette production. Dans ce contexte également, le type exacte du partenaire T reste à démontrer (lymphocytes T de type Th1, Th2, Th17 ou Treg). Il est également fortement probable que la nature elle-même de l'antigène stimulant la réponse T-dépendante pourrait déterminer l'induction ou non de la production de l'IL-24.

2.2. IL-24 et la réponse B T-indépendante

Il reste également à définir si les éventuels signaux T-indépendants, autres que ceux testés dans nos expériences (BAFF, SDF1, CPG ODN, IFN/Imiquimod…), peuvent réguler l'expression de l'IL-24 dans des cellules B. Quel est, entre autres, le rôle de l'IL-24 dans la différentiation des plasmocytes à courte durée de vie qui sont produits au cours d'une réaction extra-folliculaire (surtout dans des modèles murins) T-indépendante dans le cadre d'une réponse antibactérienne ou antivirale ? Dans ce contexte, l'interaction possible de l'IL-24 avec les voies de signalisation de l'IFNα et/ou IL-6 mérite d'être analysée. En effet, comme cela a été proposé par l'équipe de J.Banchereau dans une étude de la différentiation des plasmocytes à courte durée de vie au cours d'une réponse antivirale, le couple l'IFNα/IL-6 jouerait un rôle essentiel dans cette différentiation (Jego et al., 2003). Dans ce contexte, le rôle de l'IL-24 par rapport aux autres membres de la famille de l'IL-10 (effet synergique versus antagoniste ?) reste également à définir tout comme l'impact de l'IL-24 sur les fonctions (système immunitaire inné ou adaptatif) des autres types de cellules du système immunitaire.

2.3. IL-24 et la fonction des cellules présentatrices de l'antigène (APC)

Une question particulièrement importante concerne l'effet de l'IL-24 sur les fonctions des DC ou autres types des cellules présentatrices d'antigène. En effet, les expériences préliminaires de notre équipe suggèrent un effet stimulant sur ces fonctions.

Un outil important afin de mener à bien ces recherches serait la disponibilité de modèles des souris IL-24 KO conditionnels ou de souris transgéniques surexprimant le gènes de IL-24 dans différentes sous-populations lymphocytaires B (modèles des souris IL-24$^{flox/flox}$ croisées avec des souris CD19-Cre, BLIMP1-Cre ou Pax5-Cre) (figure 45 page suivante) ou d'autre part des souris transgéniques CD19-IL-24, BLIMP1-IL-24 ou Pax5-IL-24 (figure 46 page suivante). Ces modèles permettraient de démontrer de façon formelle le rôle de l'IL-24 (l'absence de l'expression ou l'expression constitutive) sur la différentiation lymphocytaire B et la maturation de la réponse B *in vivo*.

Croisements de souris transgéniques :

1) IL-24$^{flox/flox}$	2) IL-24$^{flox/flox}$	3) IL-24$^{flox/flox}$
X	X	X
CD19-*Cre*	**Blimp-1-*Cre***	**Pax5-*Cre***

Souris obtenues:

CD19-Cre; IL-24$^{flox/flox}$	Blimp-1-Cre; IL-24$^{flox/flox}$	Pax5-Cre; IL-24$^{flox/flox}$

Question posée:

Rôle de l'expression de l'IL24 par les cellules B dans leur différentiation fonctionnelle	Rôle de l'expression de l'IL24 par les cellules B déjà engagées dans la voie de différentiation plasmocytaire	Rôle de l'expression de l'IL24 par les cellules B déjà engagées dans la voie de différentiation mémoire

Figure 45 : modèles de souris Knock-out conditionnels pour l'analyse du rôle de l'IL24 dans la différentiation fonctionnelle de la réponse B. Grâce au système Cre/loxP, il est possible d'induire, en exprimant la recombinase Cre, l'excision d'une séquence d'ADN encadrée par deux sites loxP de même orientation. Cette technique a été largement utilisée afin d'étudier, de façon tissu/cellule spécifique, la fonction des gènes chez la souris, notamment dans le cadre ou leur inactivation biallélique germinale n'est pas viable.

Les souris transgéniques :

1)	2)	3)
CD19-IL24	**Blimp-1-IL24**	**Pax5-IL24**

Question posée:

Rôle de l'expression de l'IL24 par les cellules B dans leur différentiation fonctionnelle	Rôle de l'expression de l'IL24 par les cellules B déjà engagées dans la voie de différentiation plasmocytaire	Rôle de l'expression de l'IL24 par les cellules B déjà engagées dans la voie de différentiation mémoire

Figure 46 : modèles des souris transgéniques pour l'analyse du rôle de l'IL24 dans la différentiation fonctionnelle de la réponse B (expression constitutive du gène de l'IL24 dans la population cellulaire ciblées).

3 IL-24 et Tumeurs

3.1. LLC

IL-24 augmente la survie des cellules quiescentes dans le modèle de la LLC (Sainz-Perez et al., 2006). Il serait donc intéressant d'étudier le mécanisme moléculaire impliqué dans cet effet. D'autre part, l'IL-24 déclenche la mort par apoptose des cellules en cycle. Dans notre travail, nous avons défini un mécanisme moléculaire responsable de cet effet, et commencé à valider l'hypothèse que la présence de l'IL-24 déréprime p53, qui est considéré comme facteur de stress cellulaire et serait donc associée à l'induction de l'apoptose.

Il serait également intéressant d'étudier une corrélation possible entre l'expression de l'IL-24 dans les cellules de la LLC et leur statut mutationnel, le stade de la maladie ou le pronostique du patient.

3.2. Autres cancers

Comme dans le cas de la LLC, l'IL-24 pourrait représenter un inducteur de l'apoptose dans d'autres types de cellules cancéreuses. L'expression du récepteur de l'IL-24 déjà confirmée dans certaines cellules cancéreuses, suggèrant que l'utilisation potentielle de cette cytokine pourrait constituer une stratégie thérapeutique anti-tumorale chez l'homme.

4 L'IL-24 et les cellules endothéliales

Une question ouverte et intéressante réside dans la démonstration de l'expression et du rôle de l'IL-24 dans les cellules endothéliales. L'endothélium humain peut exprimer différentes cytokines (Mantovani et al., 1998, 1992) y compris les cytokines de la famille de l'IL-10. En effet, l'IL-10 induit l'expression de SOCS-3, un régulateur négatif de la production de différentes autres cytokines par les cellules endothéliales. Elle est également capable d'induire l'expression de molécules inhibitrices de la réponse T comme ILT3/4 (Immunoglobulin-Like Transcript 3 and 4), *via* l'induction de l'expression du facteur GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) (Gleissner et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'IL-24 sur les fonctions de cellules APC de l'endothélium humain activé et dans l'endothélium des tissus périphériques (l'expression de l'IL-24 restant à démontrer) ainsi qu'au niveau du tissu lymphoïde secondaire (résultats non publiés de Maarof et al).

5 L'IL-24 et vaccinations

Des résultats non publiés de notre équipe montrent que l'IL-24 recombinante augmente la capacité des DC dérivées de monocytes à présenter des antigènes aux lymphocytes T. Les mécanismes moléculaires de cette action restent cependant inconnus. Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'IL-24 agirait comme cytokine « co-stimulatrice » des réponses immunitaires, une action qui présenterait un intérêt potentiel dans les vaccinations. Dans ce cadre, l'IL-24 favoriserait la différentiation des cellules B mémoires qui font la réponse accélérée et qui représente l'un des objectifs majeurs de la vaccination. Il serait donc intéressant d'analyser l'association de cette cytokine aux protocoles de vaccination afin d'améliorer la réponse immune ainsi générée (figure 47).

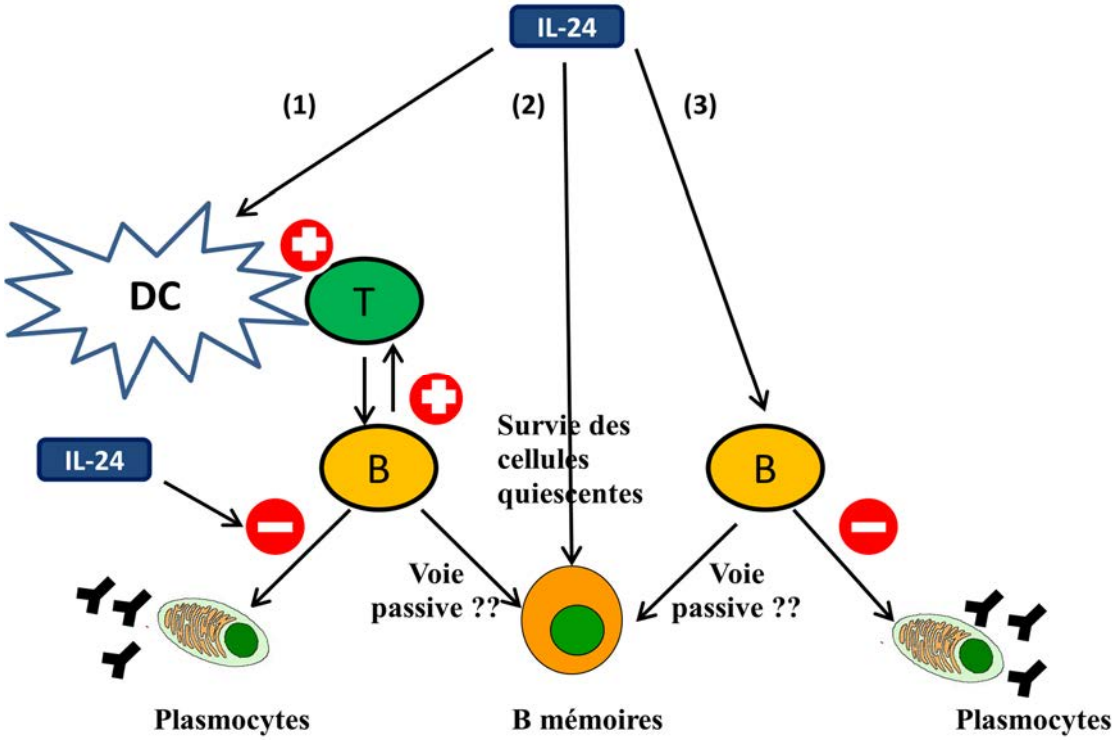


Figure 47 : Représentation schématique du rôle possible de l'IL-24 dans la vaccination. (1) l'IL-24 augmente la capacité des DC à présenter des Ag aux LT qui à leur tour active la différenciation des LB, d'une façon passive, vers la voie mémoire. (2) l'IL-24 augmente la survie des cellules hors cycle (G0/G1) ou cellules quiescentes, y compris les B mémoires. (3) l'IL-24 inhibe la différentiation plasmocytaire des LB et favorise d'une façon passive la voie B mémoire.

TRAVAIL ANNEXE

TRAVAIL ANNEXE

High Membrane Cholesterol in CLL B-Cells and Differential Expression of Cholesterol Synthesis Genes in IG GENE-Unmutated vs Mutated Cells

Cécile Tomowiak, Anne Kennel, Hélène Gary-Gouy, **Nader Hadife,** Pierre Feugier, Torsten Haferlach, MC Béné et Ali Dalloul.

Discussion de l'article :

Les travaux précédant de notre équipe conduisant à la mise au point de lignées Daudi, transfectées avec le gène du CD5 (Gary-Gouy et al., 2002) avaient été suivis d'une analyse transcriptomique de ces lignées comparées aux cellules Daudi « vecteur vide ».

Parmi les gènes induits par CD5, se trouvaient plusieurs gènes de synthèse du cholestérol à partir de HMG coA. Fait intéressant, l'expression de ces mêmes gènes est fortement induite dans les cellules de LLC (B $CD5^+$) en comparaison aux cellules B normales. Une étude a donc été lancée afin d'analyser la quantité de cholestérol membranaire dans les cellules de malades et de la comparer aux cellules B normales du sang et à la sous population B $CD5^+$ normale.

L'autre raison de cette étude est que les cellules leucémiques sont connues pour être faiblement répondeuses à une stimulation par anti-IgM. Or le cholestérol est nécessaire à l'internalisation du BCR après stimulation et maintient le caractère anergique dans un modèle de cellules B murines transgéniques HEL/anti-HEL (Bléry et al., 2006). Nous avons donc analysé l'expression du cholestérol à la surface cellulaire en utilisant sa propriété de liaison à un antibiotique fluorescent, la Filipin.

Les cellules de 26 malades ont été cultivées ou non en présence de Lovastatine, un inhibiteur de synthèse du cholestérol. Les cellules sub-G1 ont été analysées en cytométrie en flux, et les autres de Gumprecht comptées sur lames après coloration de Giemsa.

L'expression des gènes de synthèse a été analysée sur des données transcriptomiques du projet MILE incluant 150 LLC et 110 contrôles. Parmi les LLC, 134 ont été testées pour le caractère IgVH «muté » ou « non muté ».

Nos résultats expérimentaux ont confirmé l'augmentation de cholestérol sur les cellules B leucémiques comparées aux cellules B normales, y compris les cellules B $CD5^+$.

L'analyse des données du projet MILE a également confirmé que, parmi les gènes incriminés, 4 gènes (LSS, Cyp51A1, NSDHL et SC5DL) ont une expression augmentée dans les formes

indolentes « mutées » par rapport aux formes agressives « non mutées ».

Au total, une forte expression/synthèse de cholestérol serait un signe de bon pronostic et irait avec un caractère « anergique » des cellules B, plus prononcé dans les formes indolentes.

Enfin, la Lovastatine induit la mort des cellules leucémiques *in vitro* de manière dose-dépendante. L'expression d'Im n'a pas été affectée. En revanche, celle de CD19 et CD5 a été inhibée à des doses très fortes de Lovastatine (10^{-4} M).

En conclusion, une forte expression de cholestérol à la membrane plasmique des cellules de LLC jouerait un rôle physiologique et expliquerait la sensibilité des cellules aux Statines, au moins en ce qui concerne les formes « mutées » IgVH.

Malheureusement cette étude n'a pas permis de conclure que les formes graves de LLC seraient également sensibles aux Statines.

Il reste possible que ces molécules puissent être utilisées comme traitement additionnel à l'Immuno-chimiothérapie classique, ce qui nécessiterait une étude plus spécifique.

British Journal of Medicine & Medical Research
2(3): 313-326, 2012

SCIENCEDOMAIN *international*
www.sciencedomain.org

High Membrane Cholesterol in CLL B-Cells and Differential Expression of Cholesterol Synthesis Genes in IG GENE-Unmutated vs Mutated Cells

Cécile Tomowiak[1,4], Anne Kennel[1], Hélène Gary-Gouy[2], Nader Hadife[1], Pierre Feugier[1], Torsten Haferlach[3], Marie C Béné[1] and Ali Dalloul[1,2*]

[1]EA RHEM 4369, Faculté de Médecine, Nancy Université, 54511, Vandoeuvre les Nancy, France.
[2]IFR IPSIT, 32 rue des carnets, 92140, Clamart, France.
[3]MLL München Leukemia Labor, Munich, Germany.
[4]Present address: Service d'Hématologie, CHU de Poitiers, France.

Research Article

Received 15th October 2011
Accepted 7th January 2012
Online Ready 28th March 2012

ABSTRACT

Objectives: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is associated with abnormalities of the B-Cell Receptor (BCR) signalling, including low responsiveness to antigenic stimulation and constitutive phosphorylation of several components of the signalling pathway. In B-cells, BCR-mediated signalling is regulated in part by the amount of membrane cholesterol. It was observed that Statins, pharmacological inhibitors of cholesterol synthesis, induce apoptosis of CLL cells *in vitro* and *in vivo*. Having previously reported that ectopic expression of CD5 in a B-cell line stimulated the transcription of genes involved in the synthesis of cholesterol, we investigated the expression and synthesis of cholesterol in CLL B-cells.

Study Design & Methodology: Plasma membrane cholesterol in CLL cells was evaluated by staining with Filipin and Flow cytometry in 26 patients. CLL cells were cultured with Lovastatin and subG1 cells and Gumprecht's shadows counted thereafter; surface expression of IgM, CD19 and CD5 was analysed. The expression of cholesterol synthesis genes was investigated in transcriptomic data from the MILE project (150 CLL and 110 controls).

**Corresponding author: Email: ali.dalloul@medecine.uhp-nancy.fr;*

Results: We confirmed that leukemic B-cells contained more cholesterol in their plasma membranes than their normal counterparts. An enhanced expression of genes involved in the synthesis of cholesterol in CLL as compared to healthy controls was observed. Interestingly, among the 150 CLL patients analyzed, four cholesterol synthesis genes were activated in 65 “Ig-mutated” (M) in comparison to 69 “Ig-unmutated” (UM) CLLs. Leukemic cells cultured with Lovastatin exhibited a dose-response apoptosis, however surface IgM expression was unaffected and CD19 and CD5 were downregulated at highest concentrations only.
Conclusions: High membrane cholesterol in CLL cells may explain their sensitivity to Statins, with a potential difference between UM- and M-CLL.

Keywords: Chronic lymphocytic leukaemia; cholesterol; apoptosis; statins.

1. INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) expands from B-cells endowed with resistance to apoptosis and frequently stereotyped antigen receptors, as inferred from restricted IGVH and IGVL gene usage and a frequently autoreactive BCR repertoire (Chiorazzi et al., 2005; Schroeder et al., 1994; Stevenson et al., 2004). Patients segregate in two major groups, one in which the immunoglobulin heavy (IgH) chain variable fragment (VH) is in germline configuration (unmutated, UM), and the other in whom the VH gene presents somatic mutations (mutated, M) (3). UM and M patients undergo severe and mild clinical evolution respectively (Hamblin et al., 1999). The BCRs of UM and M clones use distinct variable VH genes which suggest that they can recognize different antigens and that M CLL cells have encountered this antigen which could be an infectious agent or a self-antigen (Hamblin, 1999; Klein et al., 2001; Rosenwald et al., 2001; Hervé et al., 2005; Lanemo Myhrinder et al., 2008). Yet both M and UM CLL clones originate from autoreactive cells (Hervé et al., 2005) and the malignant B-cell clone of CLL patients often produce auto-antibodies (Ruzickova et al., 2008). Most likely, CLL B-cells display properties that allow them to escape from several physiological checkpoints in charge of deleting autoreactive B-cells in the bone marrow (Wardeman et al., 2003; Lagneaux et al., 1998) and in the periphery (Meffre et al., 2008).

CLL B-cells display surface phenotype and mRNA signatures characteristic of antigen-experienced memory B-cells (Stevenson et al., 2004; Hamblin et al., 1999; Klein et al., 2001), suggesting repeated stimulation of the BCR, a condition that may lead to BCR desensitization also called anergy (Villen et al., 1999). Accordingly, in contrast with normal B-cells, the response of leukemic cells to BCR stimulation is poor as evidenced by low protein phosphorylation and intracellular Ca2+ mobilization (Michel et al., 1993; Lankester et al., 1995). However and possibly reflecting their higher proliferation capacity, UM CLL-cells are less anergic than M CLL-cells as they respond better to BCR stimulation (Stevenson et al., 2004; Lanham et al., 2003).

Following antigen encounter, the BCR moves to cholesterol/sphingolipid- enriched lipid rafts. This first step occurs before phosphorylation of the BCR complex on CD79 and activation of BCR-associated molecules (Pierce et al., 2002; Gupta et al., 2007). Cholesterol is therefore essential in regulating BCR-mediated signals especially in anergic cells (Blery et al., 2006). CD5 expression is a feature of CLL B-cells and a prominent diagnostic marker of this disease (Matutes et al., 1994). We previously generated a permanent B-cell line with ectopic

expression of CD5 at the cell surface (Gary Gouy et al., 2002). Comparing vector- and CD5-transduced cells by DNA chip technology, we were surprised to find that most cholesterol synthesis genes were activated by CD5 (Gary Gouy et al., 2007). We therefore examined whether CLL B-cells might be enriched in membrane cholesterol (possibly as a consequence of their CD5 expression) in comparison to normal B-cells. We also analyzed transcriptomic data (Haferlach et al., 2010) in search for alterations in cholesterol synthesis genes in CLL. Finally, as Statins, drugs known for their impact on cholesterol metabolism, were reported to induce the apoptosis of CLL cells (Vitols et al., 1997; Chapman Shimshoni et al., 2003), we analyzed the impact of these drugs on the expression of IgM and other cell surface markers of CLL B-cells.

2. PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients

Peripheral blood samples from a total of 26 patients, 13 males and 13 females, with a mean age of 64 year old (median: 69 y.o, range: 43-80 y.o) was used for this study. The majority of them (N= 21), presented at diagnosis with a Binet-A stage, 2 with a Binet-B stage, and 3 with Binet-C stage. Three patients had been treated with Statins at the time of diagnosis. A first series of 16 donors without CLL and any treatment with Statins (8 males and 8 females, median age 61 y.o, range 22-82 y.o) from the local blood bank and 16 CLL patients was enrolled for the appreciation of membrane cholesterol. These patients were 8 men and 8 women with a mean age of 63 years old. All presented with untreated CLL, and Binet's stages were A for 7, B for 2 and C for 1.

A second series of patients was used to test the effect of in vitro treatment with Statins. These were 14 CLL patients (7 men, 7 women), with a mean age of 59 years old. Binet's stages were A for all at the time of sampling, two initial stages C having been induced to remission after treatment.

Informed consent was obtained from all patients according to the Declaration of Helsinki and the ethical committee of the “Université de Lorraine”.

2.2 CLL Cells

Lymphocytes were obtained by Ficoll gradient centrifugation from peripheral blood collected on EDTA.

2.3 Flow Cytometry

Separated lymphocytes were resuspended at 10^6/mL and 50 µL aliquots were incubated with PC5-conjugated CD5, PC7-conjugated CD19 monoclonal antibodies (Beckman Coulter, Miami, FL). For each sample, a second tube was prepared with the addition of Filipin (Robinson et al, 1980). Briefly, this antibiotic that selectively binds to cholesterol is also fluorescent and emits above 520 nm, i.e. in the FL1 channel of most flow cytometers. The best excitation is provided by UV light, but excitation is also possible with a 488nm argon laser (Muller et al, 1984). We therefore tested labeled cells for these three markers using an FC500 two lasers flow cytometer (Beckman Coulter). Filipin (Sigma), stored in DMSO at 25 mg/mL in the dark was used as working solution at 0.05 mg/mL in PBS. Normal B-cells (CD19+/CD5-), normal T-cells (CD19-/CD5+) and normal B-1 cells or CLL cells

(CD19+/CD5+) were first gated using a CD5/CD19 biparametric scattergram. The autofluorescence signal in FL1 was recorded for each subset, then the Filipin fluorescence signal of each subset was recorded in the second tube.

2.4 Transcripts Levels of Genes Involved in Cholesterol Synthesis in CLL and Controls

As published elsewhere, the MILE project analyzed on whole genome H60 chips (Affymetrix) samples from over 3000 hematological malignancies and healthy controls (Haferlach et al., 2010). Within this data base, information was extracted for 110 healthy controls and 150 CLL patients. Mutational status was known for 135, with respectively 69 UM CLL and 66 M CLL. The list of genes of interest, selected from results of the previous transcriptome study on CD5 transfected Daudi cells, that was used for this query is shown on table 1.

Table 1. Genes involved in cholesterol synthesis that were investigated in the MILE database

Acronym	Id#	Molecule
HMGCS1	205822	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)
HMGCS1	221750	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)
HMGCR	202539	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
HMGCR	202540	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
MVK	36907	mevalonate kinase
FDFT1	208647	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
FDFT1	210950	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
FDFT1	241954	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
LSS	202245	lanosterol synthase (2;3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)
CYP51A1	202314	cytochrome P450; family 51; subfamily A; polypeptide 1
CYP51A1	216607	cytochrome P450; family 51; subfamily A; polypeptide 1
SC4MOL	209146	sterol-C4-methyl oxidase-like
SC5DL	211423	sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog; S. cerevisiae)-like
DHCR7	201790	7-dehydrocholesterol reductase
DHCR7	201791	7-dehydrocholesterol reductase

Nine genes encoding for enzymes involved in the synthesis of cholesterol from fatty acids were investigated. Their order from the top (Acetyl coA) to the bottom (cholesterol) of the cascade is: HMGCS1, HMGCR, MVK, FDFT1, LSS, Cyp51A1, SC4MOL, SC5DL, DHCR7.

2.5 Inhibition of Cholesterol by Statins

Isolated lymphocytes from 14 patients were cultured at 10^6 cells/ml for 24 hours to 6 days without (control) or with three different doses of Lovastatin (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}), at 37°C in RPMI-1640 (Gibco) with 10% Fetal Calf serum (Hyclone), in a water-saturated incubator. Apoptosis was measured in flow cytometry by DNA staining with propidium iodide using the DNA Prep kit (Beckman Coulter) by recording the percentage of sub-G1 apoptotic cells. The expression level of surface IgM, CD5 and CD19 was also measured in flow cytometry after staining as above and with an FITC-conjugated rabbit anti-human IgM antiserum. In parallel, cells were

spun down and stained with May Grünwald Giemsa in order to count Gumprecht's shadows and evaluate the live/dead cells ratio.

2.6 Statistics

Filipin expression in flow cytometry was expressed as mean fluorescence intensity (MFI) ratios comparing the MFI of the filipin signal and that of the autofluorescence in FL1. Transcriptome data were the expression levels of probesets as described elsewhere. All series were tested for normality with the Kolmogorov Smirnov test and consequently expressed as means or medians. Between groups comparisons were performed with Student's T test, paired Student's T test or Mann Whitney. Statistical significance was retained for P values lower than 0.05.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Filipin Binding, as an Indicator of Cell Surface Cholesterol, is Higher on CLL B-Cells than in Control B-Cells

Having previously shown that CD5-transfected Daudi B-cells exhibited a higher content in membrane cholesterol than vector-transfected cells (Gary Gouy et al., 2007) we undertook to compare the amount of membrane cholesterol in (almost totally CD5+)-B cells from CLL with that of B-cells from age and sex-matched controls. As shown in Figure 1A, the fluorescence of Filipin-stained cells gated on CD19+ cells, was significantly enhanced in all but 3 CLL patients as compared to total normal B-cells (figure 1B). The mean MFI ratio was 5.7 ± 3.4 in CLL and 4.1 ± 1.6 in the group of healthy controls (P = 0.048). Of interest, retrospective analysis showed that the 3 samples that were slightly less fluorescent than controls turned out to belong to patients treated with Statins (patients 13, 14 and 16). Accordingly, when the analysis was limited to« Statin-free » samples, the MFI of CLL cells (5.9 ± 3.5) was increased as compared to controls : 3.9 ± 1.4 (P = 0.045) (Figure 1B). The difference in membrane cholesterol was also significant if CLL B-cells were compared to CD5+ B- cells from healthy controls, which account for some 10% of total B-cells (Gary Gouy et al., 2002), with respective MFI ratios of 5.7 ± 3.4 vs 4.2 ± 1.4 (P = 0.05). As the normal- CD5 negative- B-cell population is almost undetectable in CLL samples we could not compare it to the leukemic clone.

Altogether, we observed that CLL B-cells were enriched in membrane cholesterol in comparison to normal CD5+ or CD5- B-cells. We next analyzed the mRNA profiles of the transcripts coding for the enzymes involved in cholesterol synthesis.

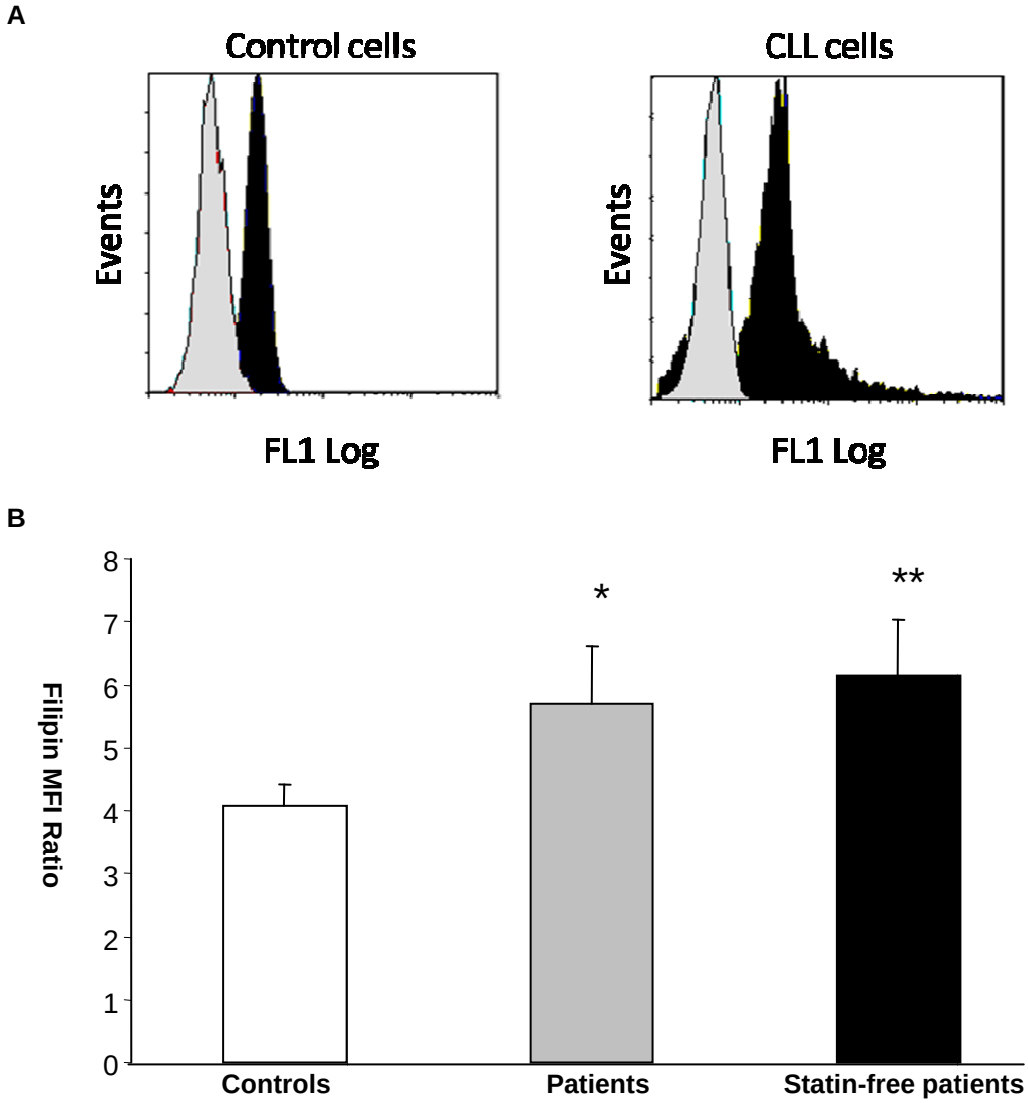


Figure 1. (A) Comparative FL1 fluorescence intensity of unstained (light gray) and Filipin stained (black) on CD19+/CD5- B-cells from a healthy control (left) and CD19+/CD5+ B-cells from a CLL patient (right). (B) Mean±SD of fluorescence ratios of all patients and controls (white histogram, n=16) or of Statin-untreated patients (black histogram, n=13). * p = 0.048, ** p = 0.044.

3.2 The Transcription of Genes Involved in Cholesterol Synthesis Vary in CLL Cells

Data from the MILE study were first plotted to compare the expression levels of 15 genes, shown to be modified by CD5 transfection of Daudi cells (Gary Gouy et al., 2007), between CLL patients and controls (table 2). Affymetrix chip analysis showed that the expression of 7 transcripts from the cholesterol synthesis pathway was significantly modified in CLL patients. This significant shift is an upregulation in 4 instances and a downregulation in 3. Interestingly the four upregulated genes, LSS, Cyp51A1, NSDHL, and SC5DL, act sequentially in the final step of the pathway to synthesize lanosterol, lathosterol and finally 7 dehydrocholesterol. However transcripts from the last gene, DHCR7, leading to the transformation of 7 dehydrocholesterol into cholesterol appear to be lower in CLL vs normal B-cells.

The second analysis performed by comparing UM and M CLL cells provided further information. It showed that all of the four significant differences implied genes of the cholesterol synthesis pathway in M-CLLs, all of which were upregulated (table 3). Among the 5 genes involved in the final pathway, LSS, SC5DL and DHCR7 were upregulated. In addition, FDFT1 acting upstream of LSS was also stimulated. In conclusion, the cholesterol synthesis pathway appears to be enhanced in M- as compared to UM-CLL.

Table 2. Transcription levels of Cholesterol Biosynthesis genes in CLL vs Controls*

Gene #	CLL N=150			P value Mann Whitney	Controls N=110		
	Median	Minimum	Maximum		Median	Minimum	Maximum
205822	36,75	8,2	103,2	NS	34,8	11,3	126,9
221750	157,1	40	396,4	<0.0001	109,15	47,3	227,7
202539	173,4	46,9	400,6	NS	184,45	78,4	400,6
202540	58,1	13,3	134	NS	53,9	4,4	132,7
36907	170,8	83,3	277,1	<0.0001	207,4	113,4	537,9
208647	771,15	326,2	2338,6	<0.0001	1265,55	585,7	3983
210950	630,85	148,9	2099,2	NS	447,2	156,2	3587
241954	83,8	20,2	309,4	NS	86,6	28,5	323,8
202245	260,05	105,8	684	<0.0001	184,2	67,6	542
202314	367	62,2	1122,6	<0.0001	260,5	65,7	668,2
216607	127,8	49,1	384,2	NS	150,55	40	302,7
209146	234,1	76,7	820,2	<0.0001	147,9	65,2	729,1
211423	280,35	75,1	1132,1	<0.0001	216	105	1148,5
201790	40	2,6	635,6	<0.0001	149,05	33,9	803,8
201791	37,75	0,7	644,4	<0.0001	125,4	5,6	683,2

** Light gray lines indicate significant downregulation in CLL cells compared to controls. Dark grey lines indicate significant upregulation in CLL cells compared to controls.*

As CD5 stimulated the cholesterol pathway genes in transfected Daudi B-cells, we wondered if the same applied to CLLs and compared the CD5 transcripts in UM-CLL vs M-CLL samples. However, CD5 transcripts levels were the same between UM (median 84.2, range 3.5-325) and M (median 84.9, range 3.7-302) CLL cells.

Table 3.Transcription levels of cholesterol synthesis genes in Unmutated vs Mutated-CLL

Gene #	Unmutated N=69			P value Mann Whitney	Mutated n=66		
	Median	Minimum	Maximum		Median	Minimum	Maximum
205822	42	8,2	103,2	NS	33,55	10,9	81,2
221750	171,2	43,1	299	NS	153,25	40	396,4
202539	180,6	54	310,7	NS	168,6	46,9	400,6
202540	55,2	13,3	128	NS	66,85	16	134
36907	164,9	88,2	277,1	NS	179,4	83,3	275,7
208647	727,5	326,2	1239,9	0.02	807,4	454,6	2338,6
210950	553,5	148,9	1523,7	NS	639,4	174,4	2099,2
241954	74,6	20,2	306,6	NS	85,65	35,3	309,4
202245	238,2	105,8	684	0.02	284,6	145,9	603,1
202314	357,3	62,2	1088,4	NS	415	91,9	1122,6
216607	128,1	49,2	301,3	NS	141	49,1	384,2
209146	235,7	88,2	529,7	NS	240,75	76,7	820,2
211423	248,6	75,1	808,3	0.003	357,85	112,2	1132,1
201790	33,2	3,2	635,6	0.03	44,55	2,6	109,3
201791	34,6	0,7	644,4	NS	42,4	5	113

** Light gray lines indicate significant downregulation in UM CLL cells compared to M CLL cells. The four genes are DHCR7, FDFT1, LSS and SC4MOL (see table 1).*

3.3 Lovastatin-Induced Cell Death and Modifications in Surface Markers of CLL Cells

For 14 patients with CLL, isolated lymphocytes were cultured for 6 days without or with three graded doses of Lovastatin from 10^{-6} to 10^{-4} M. Cells were then permeabilized and stained with propidium iodide and the percentage of hypodiploid (sub G1) cells evaluated as described previously (Gary Gouy 2007).

As shown in Figure 2, a significant increase in cell death was seen with increasing doses of lovastatin, whether the percentage of hypodiploid cells or Gumprecht's shadows were considered. In both cases Lovastatin was inefficient at 10^{-6}M but showed a significant effect at 10^{-5}M if Gumprecht's shadows were compared (p=0.002) and to a lesser extent if subG1 cells were considered (p=0.005).

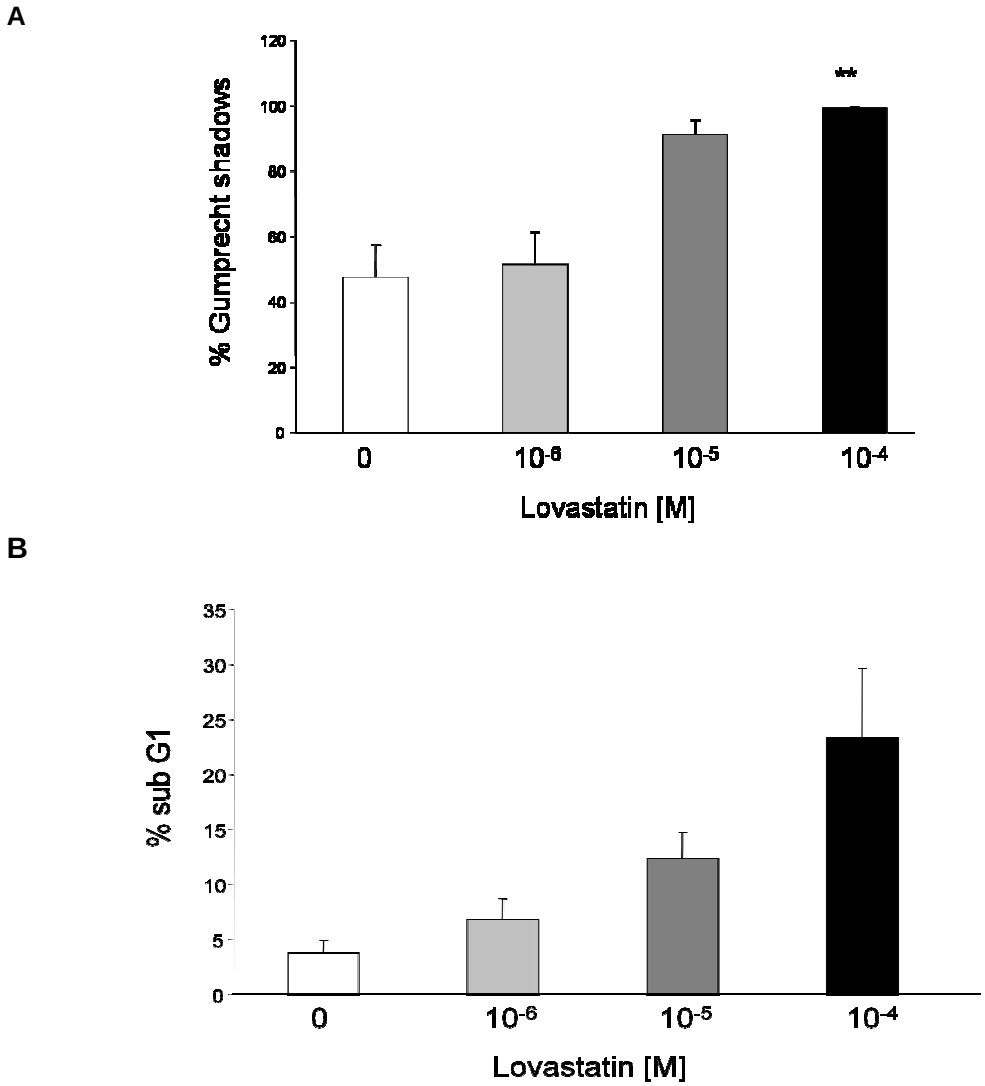


Figure 2. Apoptosis of CLL B-cells cultured for 6 days in medium without or with 3 graded doses of Lovastatin. (A): Gumprecht's shadows, (B): Hypodiploid (sub G1) cells. (n=14). ** p =0.002.

Concomitantly, the expression of IgM, CD19 and CD5 was assessed on the tumoral cells, and of CD5 on remaining T-cells. These data are shown in Table 4. Although no significant change was observed for the low expression of IgM, a significant decrease was noted on CLL cells for CD19 and CD5 expression at the highest Lovastatin concentration (p=0.01 and 0.03 respectively), and, interestingly, also for CD5 on resident T-cells upon incubation with Lovastatin (data not shown). A borderline dose-effect was also noticed, a concentration of 10^{-6} being less efficient than the two others.

Table 4. Variations in the expression of surface antigens upon 6day culture of CLL cells with Lovastatin (MFI ratios compared to day 0)

Antigen	Day 0	10^{-6} Lovastatin	P*	10^{-5} Lovastatin	P*	10^{-4} Lovastatin	P*
Surface IgM	1.1±0.6	1.2±0.8	NS	1.1±0.6	NS	1.0±0.4	NS
CD19	7.4±4.7	7.3±4.9	NS	5.4±2.7	0.01	5.3±2.6	0.01
CD5	23.1±15.1	22.9±14.1	NS	18.7±10.6	0.04	18.9±10.7	0.03
CD5 on T-cells	35.6±11.2	34.6±9.9	0.07	31±7.4	0.01	31±7.1	0.02

** Paired Student's T test's P value compared to D1*

3.4 DISCUSSION

Previous results from our group led us to hypothesize that CLL B-cells may be enriched in membrane cholesterol, possibly in relation with the expression of CD5; Data from the literature suggested that a high content in cholesterol at the plasma membrane may affect BCR trafficking and signalling (Bléry et al., 2006). Of interest, retention of the BCR in the cytoplasm of CLL cells has long been observed (Yasuda et al., 1982; Newell et al., 1983) suggesting trafficking abnormalities in this pathology. Membrane rigidity in CLL is a prominent cytological feature easily evidenced by the disruption of the cells and numerous Gumprecht's shadows on cytocentrifuged cells stained with May Grünwald Giemsa, and it is noteworthy that an increase in membrane cholesterol increases rigidity (Müller et al., 1970; An et al., 2010).

Our results demonstrate that there is more cholesterol in the plasma membranes of CLL B-cells than in the membranes of normal B-cells including the normal B-1 like CD5+ B-cell subpopulation. This finding was indirectly validated by the retrospective observation of lesser membrane cholesterol in the cells of patients receiving oral Statins than in the cells of the other patients, which is in keeping with the well known inhibitory activity of Statins on HMG-CoA reductase. Although it is tempting to attribute this difference to the effect of CD5, this is unlikely because CD5 expression was not diminished in the cells of the patients receiving Statins (data not shown) although it was inhibited *in vitro* by Lovastatin at the highest concentration (Table 4). Moreover, in our CD5-transfected cell line, 9 genes were stimulated, (as an example, a 4.5 fold stimulation was observed for MVK), and none were inhibited (Gary Gouy et al., 2007). This is at variance with the data gathered from the database of the MILE project (Haferlach et al., 2010). Although the expression of 4 gene transcripts involved in the synthesis of cholesterol is stimulated in CLL, the expression of 3 other genes is inhibited. How this could have modified cholesterol content at the membrane is difficult to interpret inasmuch as other parameters such as cholesterol trafficking and degradation should affect the whole picture and could not be analysed here. Interestingly however, we observed a difference between UM and M-CLL, which deserves a specific analysis in order to measure membrane cholesterol in both groups. Unfortunately only 2 out of 26 patients from our study were documented for IgVH mutational status (data not shown). Thus a dedicated study is needed to compare the amount of membrane cholesterol in both M and UM- CLL B-cells. How does membrane cholesterol affect BCR signaling? It has been shown that cholesterol is needed for BCR internalization in anergic but not in normal B-cells (Bléry et al., 2006). In this study on an HEL/anti-HEL double transgenic mouse model, the B-cells are anergic in vivo due to a permanent stimulation of surface immunoglobulins (sIg). Upon stimulation with antigen, sIg is internalized which desensitizes the cell to the antigen. This

process depends on cholesterol, indeed, when surface cholesterol was disrupted, sIg was restored and anergy was broken. This is reminiscent of what happened to the same mice bred in a CD5-null background (Hippen et al., 2000) which resulted in the loss of anergy characterized by autoimmune haemolytic anemia. Together with our data, the abovementioned results suggest a direct link between CD5 expression, membrane cholesterol and anergy in CLL B-cells. Here, the lower amounts of transcripts for relevant membrane cholesterol synthesis pathway molecules observed in UM-CLL compared to M-CLL is meaningful and may correlate with the "lesser anergic state" of the aggressive-subset in comparison to the indolent one.

As patients treated with Statins displayed lesser membrane cholesterol on their B-cells than untreated patients, we investigated *in vitro* the effect of Statins on the expression of IgM with the possibility in mind that it would be augmented. Although Lovastatin failed to change the expression of sIgM, it induced a significant decrease of that of CD19 and CD5. Moreover, we were able to confirm the results of others on the apoptotic effect of Statins (Vitols et al., 1997; Chapman Shimshoni et al., 2003). The action of these molecules is far from being limited to cholesterol. Statins may inhibit the farnesylation of key molecules such as ras (Cox et al., 1992) and lamins (Cox; Karp et al., 2001) involved respectively in cell proliferation and gene expression (Dechat et al., 2007). Finally, whether UM-CLL are more sensitive to Statins than M-CLL because of lower cholesterol content, should be explored as Statins could be useful adjuvants for chemotherapy (Fuchs et al., 2008; De Jong Peeters et al., 2009).

4. CONCLUSION

CLL B-cells are sensitive to inhibitors of cholesterol synthesis, and display an enhanced expression of cholesterol synthesis genes. Although it is tempting to attribute the increased sensitivity of CLL B-cells to Statins to their high cholesterol expression and possibly requirements in cholesterol, our study does not support this hypothesis. The relative amounts of membrane cholesterol and sensitivity to Statins between U- and UM-CLL should be evaluated in a specific study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by a grant from the "Ligue contre le Cancer, Région Grand Est".

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

An, H., Nussio, M.R., Huson, M.G., Voelcker, N.H., Shapter, J.G. (2010). Material properties of lipid microdomains: force-volume imaging study of the effect of cholesterol on lipid microdomain rigidity. Biophys J., 99, 834-844.

Blery, M., Tze, L., Misosge, L.A., Jun, J.E., Goodnow, C.C. (2006). Essential role of membrane cholesterol in accelerated BCR internalization and uncoupling from NF-kappa B in B cell clonal anergy. J Exp Med., 203, 1773-1783.

Chapman-Shimshonni, D., Yuklea, M., Radnay, J., Shapiro, H., Lishner, M. (2003). Simvastatin induced apoptosis of B-CLL cells by activation of mitochondrial caspase 9. Exp Hematol., 31, 779-783.

Chiorazzi, N., Rai, K.R., Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med., 352, 804-815.

Cox, A.D., Der, C.J. (1992). The Ras/cholesterol connection: implications for ras oncogenicity. Crit Rev Oncog., 3, 365-400.

Dechat, T., Shimi, T., Adam, S.A., Rusinol, A.E., Andres, D.A., Spielmann, H.P., Sinensky, M.S., Goldman, R.D. (2007). Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. Proc Natl Acad Sci., U S A., 104, 4955-4960.

De Jonge-Peeters, S.D., van der Weide, K., Kuipers, F., Sluiter, W.J., de Vries, E.G., Vellenga, E. (2009). Variability in responsiveness to lovastatin of the primitive CD34+ AML subfraction compared to normal CD34+ cells. Ann Hematol., 88, 573-580.

Fuchs, D., Berges, C., Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes bortezomib-induced apoptosis resistance by disrupting a geranyl pyrophosphate-dependent survival pathway. (2008). Biochem Biophys Res Commun., 374, 309-314.

Gary-Gouy, H., Harriague, J., Bismuth, G., Platzer, C., Schmitt, C., Dalloul, A.H. (2002). CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. Blood, 100, 4537-4543.

Gary-Gouy, H., Sainz-Perez, A., Marteau, J.B., Marfaing-Koka, A., Delic, J., Merle-Beral, H., Galanaud, P., Dalloul, A. (2007). Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. J Immunol., 179, 4335-4344.

Gupta, N., DeFranco, A.L. (2007). Lipid rafts and B cell signaling. Semin Cell Dev Biol., 18, 616-626.

Haferlach, T., Kohlmann, A., Wieczorek, L., Basso, G., Kronnie, G.T., Béné, M.C., De Vos, J., Hernández, J.M., Hofmann, W.K., Mills, K.I., Gilkes, A., Chiaretti, S., Shurtleff, S.A., Kipps, T.J., Rassenti, L.Z., Yeoh, A.E., Papenhausen, P.R., Liu, W.M., Williams, P.M., Foa, R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. J. Clin. Oncol., 28, 2529-2537.

Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood, 1848-1854.

Hervé, M., Xu, K., Ng, Y.S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B.T., Chiorazzi, N., Meffre, E. (2005). Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. J Clin Invest., 115, 1636-1643.

Hippen, K.L., Tze, L.E., Behrens, T.W. (2000). CD5 maintains tolerance in anergic B cells. J Exp Med., 191, 883-890.

Karp, J.E., Lancet, J.E., Kaufmann, S.H., End, D.W., Wright, J.J., Bol, K., Horak, I., Tidwell, M.L., Liesveld, J., Kottke, T.J., Ange, D., Buddharaju, L., Gojo, I., Highsmith, W.E., Belly, R.T., Hohl, R.J., Rybak, M.E., Thibault, A., Rosenblatt, J. (2001). Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. Blood, 97, 3361-3369.

Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A., Dalla-Favera, R. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med., 194, 1625-1638.

Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. Blood, 91, 2387-2396.

Lanemo Myhrinder, A., Hellqvist, E., Sidorova, E., Söderberg, A., Baxendale, H., Dahle, C., Willander, K., Tobin, G., Bäckman, E., Söderberg, O., Rosenquist, R., Hörkkö, S., Rosén, A. (2008). A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. Blood, 111, 3838-3848.

Lanham, S., Hamblin, T., Oscier, D., Ibbotson, R., Stevenson, F., Packham, G. (2003). Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 101, 1087-1093.

Lankester, A.C., van Schijndel, G.M., van der Schoot, C.E., van Oers, M.H., van Noesel, C.J., van Lier, R.A. (1995). Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood, 86, 1090-1097.

Matutes, E., Owsuh-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T.H. et al. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia, 8, 1640-45.

Meffre, E., Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. Curr Opin Immunol, 20, 632-638.

Michel, F., Merle-Béral, H., Legac, E., Michel, A., Debré, P., Bismuth, G. (1993). Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. J Immunol, 150, 3624-3633.

Muller, C.P., Stephany, D.A., Winkler, D.F., Hoeg, J.M., Demosky, S.J. Jr., Wunderlich, J.R. (1984). Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. Cytometry., 5, 42-54.

Müller, D., Ferger, W., Missmahl, H.P. (1970). Origin and meaning of Gumprecht's nuclear shadows in chronic lymphatic leukemia. Blut., 21, 201-209.

Newell, D.G., Harris, A.H., Smith, J.L. (1983). The ultrastructural localization of immunoglobulin in chronic lymphocytic lymphoma cells: changes in light and heavy chain distribution induced by mitogen stimulation. Blood, 61, 511-519.

Pierce, S.K. (2002). Lipid rafts and B-cell activation. Nature Rev Immunol. 2, 96-105.

Robinson, J.M., Karnovsky, M.J. (1980). Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. J Histochem Cytochem, 282, 161-168.

Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J.C., Grever, M.R., Cheson, B.D., Chiorazzi, N., Wilson, W.H., Kipps, T.J., Brown, P.O., Staudt, L.M. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med., 194, 1639-1647.

Ruzickova, S., Pruss, A., Odendahl, M., Wolbart, K., Burmester, G.R., Scholze, J., Dörner, T., Hansen, A. (2002). Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intraclonal immunoglobulin light-chain diversity in V(H)4-34 expressing single leukemic B cells. Blood, 100, 3419-3422.

Schroeder, H.W. Jr., DiGhiero, G. (1994). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. Immunol Today, 15, 288-294.

Stevenson, F.K., Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. Blood, 103, 4389-4395.

Vilen, B.J., Nakamura, T., Cambier, J.C. (1999). Antigen-stimulated dissociation of BCR mIg from Ig-alpha/Ig-beta: implications for receptor desensitization. Immunity, 2, 239-248.

Vitols, S., Angelin, B., Juliusson, G. (1997). Simvastatin impairs mitogen-induced proliferation of malignant B-lymphocytes from humans-in vitro and in vivo studies. Lipids, 32, 255-262.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science, 301, 1374-1377.

Yasuda, N., Kanoh, T., Shirakawa, S., Uchino, H. (1982). Intracellular immunoglobulins in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukaemia: an immunoelectron microscopic study. Leuk Res., 6, 659-67.

© 2012 Tomowiak et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adami, H.O., Tsaih, S., Lambe, M., Hsieh, C., Adami, J., Trichopoulos, D., Melbye, M., Glimelius, B., 1997. Pregnancy and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study. Int. J. Cancer 70, 155–158.

Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., Komiyama, A., 2000. CD27: a memory B-cell marker. Immunol. Today 21, 204–206.

Ahn, Y.O., Koo, H.H., Park, B.J., Yoo, K.Y., Lee, M.S., 1991. Incidence estimation of leukemia among Koreans. J. Korean Med. Sci. 6, 299–307.

Akiyama, M., Hideshima, T., Hayashi, T., Tai, Y.-T., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Chauhan, D., Richardson, P., Munshi, N.C., Anderson, K.C., 2002. Cytokines modulate telomerase activity in a human multiple myeloma cell line. Cancer Res. 62, 3876–3882.

Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Disteche, C.M., Simoneaux, D.K., 1993. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science 259, 990–993.

Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., Hardy, R.R., 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. J. Immunol. 167, 6834–6840.

Anderson, C.F., Oukka, M., Kuchroo, V.J., Sacks, D., 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. J. Exp. Med. 204, 285–297.

Andreeff, M., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T.K., Clarkson, B.D., Melamed, M.R., 1980. Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. Blood 55, 282–293.

Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B., Rao, A., 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. Annu. Rev. Immunol. 24, 607–656.

Arpin, C., Déchanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Brière, F., Banchereau, J., Liu, Y.J., 1995. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. Science 268, 720–722.

Assaily, W., Benchimol, S., 2006. Differential utilization of two ATP-generating pathways is regulated by p53. Cancer Cell 10, 4–6.

Attanavanich, K., Kearney, J.F., 2004. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. J. Immunol. 172, 803–811.

Avery, D.T., Ellyard, J.I., Mackay, F., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tangye, S.G., 2005. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. J. Immunol. 174, 4034–4042.

Avila-Cariño, J., Lewin, N., Tomita, Y., Szeles, A., Sandlund, A., Mosolits, S., Mellstedt, H., Klein, G., Klein, E., 1997. B-CLL cells with unusual properties. Int. J. Cancer 70, 1–8.

Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., Kearney, J., 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. Immunity 17, 341–352.

Banchereau, J., Rousset, F., 1992. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. Adv. Immunol. 52, 125–262.

Barnabas, N., Shurafa, M., Van Dyke, D.L., Wolman, S.R., Clark, D., Worsham, M.J., 2001. Significance of p53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of 30 patients. Cancer 91, 285–293.

Bartlett, N.W., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Kotenko, S.V., McVey, C.E., Lee, H.-J., Smith, G.L., 2004. A new member of the interleukin 10-related cytokine family encoded by a poxvirus. J. Gen. Virol. 85, 1401–1412.

Baumgarth, N., Tung, J.W., Herzenberg, L.A., 2005. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Semin. Immunopathol. 26, 347–362.

Bell, P.B., Rooney, N., Bosanquet, A.G., 1999. CD79a detected by ZL7.4 separates chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma in the leukemic phase. Cytometry 38, 102–105.

Berg, D.J., Leach, M.W., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Davidson, N.J., Rennick, D., 1995. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. J. Exp. Med. 182, 99–108.

Bernard, A., Coitot, S., Brémont, A., Bernard, G., 2005. T and B cell cooperation: a dance of life and death. Transplantation 79, S8–S11.

Bernasconi, N.L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A., 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. Science 298, 2199–2202.

Berton, M.T., Uhr, J.W., Vitetta, E.S., 1989. Synthesis of germ-line gamma 1 immunoglobulin heavy-chain transcripts in resting B cells: induction by interleukin 4 and inhibition by interferon gamma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 2829–2833.

Bianco, E., Marcucci, F., Mele, A., Musto, P., Cotichini, R., Sanpaolo, M.G., Iannitto, E., De Renzo, A., Martino, B., Specchia, G., Montanaro, M., Barbui, A.M., Nieddu, R., Pagano, L., Rapicetta, M., Franceschi, S., Mandelli, F., Pulsoni, A., 2004. Prevalence of hepatitis C virus infection in lymphoproliferative diseases other than B-cell non-Hodgkin's lymphoma, and in myeloproliferative diseases: an Italian Multi-Center case-control study. Haematologica 89, 70–76.

Bichi, R., Shinton, S.A., Martin, E.S., Koval, A., Calin, G.A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R.R., Croce, C.M., 2002. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 6955–6960.

Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S., Gremy, F., 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 48, 198–206.

Bishop, G.A., Hostager, B.S., 2003. The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. Cytokine Growth Factor Rev. 14, 297–309.

Black, S.J., Van der Loo, W., Loken, M.R., Herzenberg, L.A., 1978. Expression of IgD by murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells. J. Exp. Med. 147, 984–996.

Bléry, M., Tze, L., Miosge, L.A., Jun, J.E., Goodnow, C.C., 2006. Essential role of membrane cholesterol in accelerated BCR internalization and uncoupling from NF-kappa B in B cell clonal anergy. J. Exp. Med. 203, 1773–1783.

Blink, E.J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., 2005. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. J. Exp. Med. 201, 545–554.

Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., Haugen, H., Jelinek, L., Kelly, J.D., Madden, K., Maurer, M.F., Parrish-Novak, J., Prunkard, D., Sexson, S., Sprecher, C., Waggie, K., West, J., Whitmore, T.E., Yao, L., Kuechle, M.K., Dale, B.A., Chandrasekher, Y.A., 2001. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. Cell 104, 9–19.

Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.-C., Morel, F., 2005. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J. Immunol. 174, 3695–3702.

Bøyum, A., 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. Suppl 5, 9–15.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., Förster, R., 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. J. Exp. Med. 192, 1545–1552.

Brezinschek, H.P., Dörner, T., Monson, N.L., Brezinschek, R.I., Lipsky, P.E., 2000. The influence of CD40-CD154 interactions on the expressed human V(H) repertoire: analysis of V(H) genes expressed by individual B cells of a patient with X-linked hyper-IgM syndrome. Int. Immunol. 12, 767–775.

Brière, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J.M., Saint-Remy, J.M., Banchereau, J., 1994. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. J. Exp. Med. 179, 757–762.

Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., Kipps, T.J., 2000. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. Blood 96, 2655–2663.

BURNET, F.M., 1957. Biology and medicine. Med. J. Aust. 44, 406–410.

Cabezudo, E., Carrara, P., Morilla, R., Matutes, E., 1999. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. Haematologica 84, 413–418.

Cai, G., Kastelein, R.A., Hunter, C.A., 1999. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. Eur. J. Immunol. 29, 2658–2665.

Calame, K., 2006. Transcription factors that regulate memory in humoral responses. Immunol. Rev. 211, 269–279.

Caligaris-Cappio, F., 1996. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. Blood 87, 2615–2620.

Cancro, M.P., 2004. Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. Immunol. Rev. 197, 89–101.

Carsetti, R., Köhler, G., Lamers, M.C., 1995. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. J. Exp. Med. 181, 2129–2140.

Carsetti, R., Rosado, M.M., Wardmann, H., 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. Immunol. Rev. 197, 179–191.

Cartwright, R.A., Gurney, K.A., Moorman, A.V., 2002. Sex ratios and the risks of haematological malignancies. Br. J. Haematol. 118, 1071–1077.

Caudell, E.G., Mumm, J.B., Poindexter, N., Ekmekcioglu, S., Mhashilkar, A.M., Yang, X.H., Retter, M.W., Hill, P., Chada, S., Grimm, E.A., 2002. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. J. Immunol. 168, 6041–6046.

Cerutti, A., Schaffer, A., Shah, S., Zan, H., Liou, H.C., Goodwin, R.G., Casali, P., 1998. CD30 is a CD40-inducible molecule that negatively regulates CD40-mediated immunoglobulin class switching in non-antigen-selected human B cells. Immunity 9, 247–256.

Chan, J.R., Blumenschein, W., Murphy, E., Diveu, C., Wiekowski, M., Abbondanzo, S., Lucian, L., Geissler, R., Brodie, S., Kimball, A.B., Gorman, D.M., Smith, K., De Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., McClanahan, T.K., Bowman, E.P., 2006. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. J. Exp. Med. 203, 2577–2587.

Chang, C., Magracheva, E., Kozlov, S., Fong, S., Tobin, G., Kotenko, S., Wlodawer, A., Zdanov, A., 2003. Crystal structure of interleukin-19 defines a new subfamily of helical cytokines. J. Biol. Chem. 278, 3308–3313.

Chaplin, D.D., 2006. 1. Overview of the human immune response. J. Allergy Clin. Immunol. 117, S430–435.

Chena, C., Arrossagaray, G., Scolnik, M., Palacios, M.F., Slavutsky, I., 2003. Interphase cytogenetic analysis in Argentinean B-cell chronic lymphocytic leukemia patients: association of trisomy 12 and del(13q14). Cancer Genet. Cytogenet. 146, 154–160.

Christmann, M., Tomicic, M.T., Origer, J., Kaina, B., 2005. Fen1 is induced p53 dependently and involved in the recovery from UV-light-induced replication inhibition. Oncogene 24, 8304–8313.

Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., Mackay, C.R., 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. J. Immunol. 173, 68–78.

Chung, J.B., Silverman, M., Monroe, J.G., 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. Trends Immunol. 24, 343–349.

Clark, M.R., Massenburg, D., Siemasko, K., Hou, P., Zhang, M., 2004. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. Curr. Opin. Immunol. 16, 382–387.

Clark, R., Strasser, J., McCabe, S., Robbins, K., Jardieu, P., 1993. Insulin-like growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. J. Clin. Invest. 92, 540–548.

Coffman, R.L., Carty, J., 1986. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. J. Immunol. 136, 949–954.

Coffman, R.L., Lebman, D.A., Shrader, B., 2009. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. J. Exp. Med. 1989. 170: 1039-1044. J. Immunol. 182, 8–13.

Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A., Paul, W.E., 1986. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J. Immunol. 136, 4538–4541.

Cohen, S.B., Crawley, J.B., Kahan, M.C., Feldmann, M., Foxwell, B.M., 1997. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. Immunology 92, 1–5.

Collins, J.T., Dunnick, W.A., 1993. Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. Int. Immunol. 5, 885–891.

Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L., Gray, D., 2006. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. J. Immunol. 176, 3498–3506.

Cunningham, A.F., Serre, K., Mohr, E., Khan, M., Toellner, K.-M., 2004. Loss of CD154 impairs the Th2 extrafollicular plasma cell response but not early T cell proliferation and interleukin-4 induction. Immunology 113, 187–193.

Cuttner, J., 1992. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer Invest. 10, 103–109.

Dameshek, W., 1967. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunolgically incompetent lymphocytes. Blood 29, Suppl:566–584.

Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M., Chiorazzi, N., 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 94, 1840–1847.

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. Cell 116, 205–219.
Deans, J.P., Polyak, M.J., 2008. FMC7 is an epitope of CD20. Blood 111, 2492; author reply 2493–2494.
Diehl, L.F., Karnell, L.H., Menck, H.R., 1999. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer 86, 2684–2692.
Diehl, S.A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., Van Haren, S.D., Kwakkenbos, M.J., Yasuda, E., Beaumont, T., Scheeren, F.A., Spits, H., 2008. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. J. Immunol. 180, 4805–4815.
Dighiero, G., Hamblin, T.J., 2008. Chronic lymphocytic leukaemia. Lancet 371, 1017–1029.
Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., Shevach, E.M., 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J. Immunol. 151, 1224–1234.
Ding, L., Shevach, E.M., 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. J. Immunol. 148, 3133–3139.
DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fischer, A., De Saint Basile, G., 1993. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature 361, 541–543.
Döhner, H., Stilgenbauer, S., Döhner, K., Bentz, M., Lichter, P., 1999. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. J. Mol. Med. 77, 266–281.
Dokka, S., Shi, X., Leonard, S., Wang, L., Castranova, V., Rojanasakul, Y., 2001. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 280, L1196–1202.
Dörner, T., Radbruch, A., 2005. Selecting B cells and plasma cells to memory. J. Exp. Med. 201, 497–499.
Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., Ruddle, N.H., 2006. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. Nat. Immunol. 7, 344–353.
Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., Alt, F.W., 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. Adv. Immunol. 86, 43–112.
Dumoutier, L., Leemans, C., Lejeune, D., Kotenko, S.V., Renauld, J.C., 2001. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J. Immunol. 167, 3545–3549.
Dumoutier, L., Louahed, J., Renauld, J.C., 2000a. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. J. Immunol. 164, 1814–1819.
Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D., Renauld, J.C., 2000b. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 10144–10149.
Durandy, A., 2002. Hyper-IgM syndromes: a model for studying the regulation of class switch recombination and somatic hypermutation generation. Biochem. Soc. Trans. 30, 815–818.
Durandy, A., Revy, P., Imai, K., Fischer, A., 2005. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. Immunol. Rev. 203, 67–79.
Duursma, A., Agami, R., 2005. p53-Dependent regulation of Cdc6 protein stability controls cellular proliferation. Mol. Cell. Biol. 25, 6937–6947.

Ehrlich, P., 1899. Croonian Lecture: On Immunity with Special Reference to Cell Life. Proceedings of the Royal Society of London (1854-1905) 66, 424–448.

Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J., Mhashilkar, A.M., Sahin, A.A., Read, C.M., Prieto, V.G., Chada, S., Grimm, E.A., 2001. Down-regulated melanoma differentiation associated gene (mda-7) expression in human melanomas. Int. J. Cancer 94, 54–59.

Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J.A., Mumm, J.B., Zheng, M., Broemeling, L., Prieto, V.G., Stewart, A.L., Mhashilkar, A.M., Chada, S., Grimm, E.A., 2003. Negative association of melanoma differentiation-associated gene (mda-7) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human melanoma: MDA-7 regulates iNOS expression in melanoma cells. Mol. Cancer Ther. 2, 9–17.

Ellerhorst, J.A., Prieto, V.G., Ekmekcioglu, S., Broemeling, L., Yekell, S., Chada, S., Grimm, E.A., 2002. Loss of MDA-7 expression with progression of melanoma. J. Clin. Oncol. 20, 1069–1074.

Ellyard, J.I., Avery, D.T., Phan, T.G., Hare, N.J., Hodgkin, P.D., Tangye, S.G., 2004. Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. Blood 103, 3805–3812.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35, 495–516.

Enk, A.H., Angeloni, V.L., Udey, M.C., Katz, S.I., 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. J. Immunol. 151, 2390–2398.

Erickson, L.D., Durell, B.G., Vogel, L.A., O'Connor, B.P., Cascalho, M., Yasui, T., Kikutani, H., Noelle, R.J., 2002. Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40. J. Clin. Invest. 109, 613–620.

Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., Da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., Lipsky, P.E., 2005. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. J. Immunol. 175, 7867–7879.

Fialkow, P.J., Najfeld, V., Reddy, A.L., Singer, J., Steinmann, L., 1978. Chronic lymphocytic leukaemia: Clonal origin in a committed B-lymphocyte progenitor. Lancet 2, 444–446.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T.R., 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med. 170, 2081–2095.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., O'Garra, A., 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J. Immunol. 146, 3444–3451.

Fornek, J.L., Tygrett, L.T., Waldschmidt, T.J., Poli, V., Rickert, R.C., Kansas, G.S., 2006. Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. Blood 107, 1085–1091.

Fu, S.M., Winchester, R.J., Feizi, T., Walzer, P.D., Kunkel, H.G., 1974. Idiotypic specificity of surface immunoglobulin and the maturation of leukemic bone-marrow-derived lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4487–4490.

Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B., Chellappan, S., 2003. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. J. Biol. Chem. 278, 47853–47861.

Gallagher, G., Dickensheets, H., Eskdale, J., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Peat, J.D., Vazquez, N., Pestka, S., Donnelly, R.P., Kotenko, S.V., 2000. Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). Genes Immun. 1, 442–450.

Garn, H., Schmidt, A., Grau, V., Stumpf, S., Kaufmann, A., Becker, M., Gemsa, D., Siese, A., 2002. IL-24 is expressed by rat and human macrophages. Immunobiology 205, 321–334.

Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., Jenkins, M.K., 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. Science 281, 96–99.

Gary-Gouy, H., Harriague, J., Bismuth, G., Platzer, C., Schmitt, C., Dalloul, A.H., 2002. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. Blood 100, 4537–4543.

Gary-Gouy, H., Sainz-Perez, A., Marteau, J.-B., Marfaing-Koka, A., Delic, J., Merle-Beral, H., Galanaud, P., Dalloul, A., 2007. Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. J. Immunol. 179, 4335–4344.

Gaudin, E., Rosado, M., Agenes, F., McLean, A., Freitas, A.A., 2004. B-cell homeostasis, competition, resources, and positive selection by self-antigens. Immunol. Rev. 197, 102–115.

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kühn, R., Müller, W., Trinchieri, G., Sher, A., 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. J. Immunol. 157, 798–805.

Geier, J.K., Schlissel, M.S., 2006. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. Semin. Immunol. 18, 31–39.

Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., Defrance, T., 2007. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. J. Immunol. 178, 7779–7786.

Gibson, L.F., Piktel, D., Landreth, K.S., 1993. Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. Blood 82, 3005–3011.

Gleissner, C.A., Zastrow, A., Klingenberg, R., Kluger, M.S., Konstandin, M., Celik, S., Haemmerling, S., Shankar, V., Giese, T., Katus, H.A., Dengler, T.J., 2007. IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. Eur. J. Immunol. 37, 177–192.

Gogolák, P., Réthi, B., Hajas, G., Rajnavölgyi, E., 2003. Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. J. Mol. Recognit. 16, 299–317.

Goldin, L.R., Pfeiffer, R.M., Li, X., Hemminki, K., 2004. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. Blood 104, 1850–1854.

Gottardi, D., Alfarano, A., De Leo, A.M., Stacchini, A., Aragno, M., Rigo, A., Veneri, D., Zanotti, R., Pizzolo, G., Caligaris-Cappio, F., 1996. In leukaemic CD5+ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. Br. J. Haematol. 94, 612–618.

Gougeon, M.-L., 2003. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. Nat. Rev. Immunol. 3, 392–404.

Gourley, T.S., Wherry, E.J., Masopust, D., Ahmed, R., 2004. Generation and maintenance of immunological memory. Semin. Immunol. 16, 323–333.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J., 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J. Biol. Chem. 274, 1156–1163.

Grünig, G., Corry, D.B., Leach, M.W., Seymour, B.W., Kurup, V.P., Rennick, D.M., 1997. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. J. Exp. Med. 185, 1089–1099.

Habu, T., Wakabayashi, N., Yoshida, K., Yomogida, K., Nishimune, Y., Morita, T., 2004. p53 Protein interacts specifically with the meiosis-specific mammalian RecA-like protein DMC1 in meiosis. Carcinogenesis 25, 889–893.

Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., Stevenson, F.K., 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 94, 1848–1854.

Hangartner, L., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. Nat. Rev. Immunol. 6, 231–243.

Hayakawa, K., Ishii, R., Yamasaki, K., Kishimoto, T., Hardy, R.R., 1987. Isolation of high-affinity memory B cells: phycoerythrin as a probe for antigen-binding cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 1379–1383.

He, M., Liang, P., 2010. IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis. J. Immunol. 184, 1793–1798.

Heemskerk, V.H., Daemen, M.A., Buurman, W.A., 1999. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev. 10, 5–14.

Hibi, T., Dosch, H.M., 1986. Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow. Eur. J. Immunol. 16, 139–145.

Higa, L.A., Banks, D., Wu, M., Kobayashi, R., Sun, H., Zhang, H., 2006. L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. Cell Cycle 5, 1675–1680.

Höfer, T., Muehlinghaus, G., Moser, K., Yoshida, T., E Mei, H., Hebel, K., Hauser, A., Hoyer, B., O Luger, E., Dörner, T., Manz, R.A., Hiepe, F., Radbruch, A., 2006. Adaptation of humoral memory. Immunol. Rev. 211, 295–302.

Horst, A., Hunzelmann, N., Arce, S., Herber, M., Manz, R.A., Radbruch, A., Nischt, R., Schmitz, J., Assenmacher, M., 2002. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE+ plasma cell frequency with IgE serum titre. Clin. Exp. Immunol. 130, 370–378.

Huang, E.Y., Madireddi, M.T., Gopalkrishnan, R.V., Leszczyniecka, M., Su, Z., Lebedeva, I.V., Kang, D., Jiang, H., Lin, J.J., Alexandre, D., Chen, Y., Vozhilla, N., Mei, M.X., Christiansen, K.A., Sivo, F., Goldstein, N.I., Mhashilkar, A.B., Chada, S., Huberman, E., Pestka, S., Fisher, P.B., 2001. Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. Oncogene 20, 7051–7063.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., Aguet, M., 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 259, 1742–1745.

Hunt, P., Eardley, D.D., 1986. Suppressive effects of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF1) on immune responses. J. Immunol. 136, 3994–3999.

Inamine, A., Takahashi, Y., Baba, N., Miyake, K., Tokuhisa, T., Takemori, T., Abe, R., 2005. Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. Int. Immunol. 17, 581–589.

Ishida, H., Hastings, R., Kearney, J., Howard, M., 1992. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. J. Exp. Med. 175, 1213–1220.

Itälä, M., Vainio, O., Remes, K., 1996. Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia. Eur. J. Haematol. 57, 46–53.

Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Glimcher, L.H., 2003. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. Immunol. Rev. 194, 29–38.

Jankovic, D., Kullberg, M.C., Feng, C.G., Goldszmid, R.S., Collazo, C.M., Wilson, M., Wynn, T.A., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Sher, A., 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. J. Exp. Med. 204, 273–283.

Jankovic, M., Casellas, R., Yannoutsos, N., Wardemann, H., Nussenzweig, M.C., 2004. RAGs and regulation of autoantibodies. Annu. Rev. Immunol. 22, 485–501.

Jardieu, P., Clark, R., Mortensen, D., Dorshkind, K., 1994. In vivo administration of insulin-like growth factor-I stimulates primary B lymphopoiesis and enhances lymphocyte recovery after bone marrow transplantation. J. Immunol. 152, 4320–4327.

Jego, G., Bataille, R., Pellat-Deceunynck, C., 2001. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. Blood 97, 1817–1822.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., Banchereau, J., 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity 19, 225–234.

Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J.L., Bataille, R., Pellat-Deceunynck, C., 1999. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. Blood 94, 701–712.

Jeurissen, A., Ceuppens, J.L., Bossuyt, X., 2004. T lymphocyte dependence of the antibody response to “T lymphocyte independent type 2” antigens. Immunology 111, 1–7.

Jiang, H., Lin, J.J., Su, Z.Z., Goldstein, N.I., Fisher, P.B., 1995. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. Oncogene 11, 2477–2486.

Jiang, H., Su, Z.Z., Lin, J.J., Goldstein, N.I., Young, C.S., Fisher, P.B., 1996. The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 9160–9165.

Jinquan, T., Larsen, C.G., Gesser, B., Matsushima, K., Thestrup-Pedersen, K., 1993. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. J. Immunol. 151, 4545–4551.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., Crotty, S., 2009. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. Science 325, 1006–1010.

Jones, H.P., Whittaker, J.A., 1991. Chronic lymphatic leukaemia: an investigation of HLA antigen frequencies and white cell differential counts in patients, relatives and controls. Leuk. Res. 15, 543–549.

Jung, J., Choe, J., Li, L., Choi, Y.S., 2000. Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. Eur. J. Immunol. 30, 2437–2443.

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Nutt, S.L., 2004. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. J. Exp. Med. 200, 967–977.

Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1994. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. J. Immunol. 152, 3559–3569.

Kato, M.V., 1999. The mechanisms of death of an erythroleukemic cell line by p53: involvement of the microtubule and mitochondria. Leuk. Lymphoma 33, 181–186.

Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., Kikutani, H., 1994. The immune responses in CD40-deficient mice:

impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. Immunity 1, 167–178.
Kawano, M.M., Mihara, K., Huang, N., Tsujimoto, T., Kuramoto, A., 1995. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. Blood 85, 487–494.
Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26, 239–257.
Kettenhofen, R., Hoppe, J., Eberhard, G., Seul, C., Ko, Y., Sachinidis, A., 2001. Regulation of Gadd45a mRNA expression in vascular smooth muscle under growth and stress conditions. Cell. Signal. 13, 787–799.
Kim, C.H., 2005. The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. Curr. Opin. Hematol. 12, 298–304.
Kim, J.R., Lim, H.W., Kang, S.G., Hillsamer, P., Kim, C.H., 2005. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. BMC Immunol. 6, 3.
Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., Rai, K., Hines, J., Reed, J.C., 1998. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. Blood 91, 3379–3389.
Klein, U., Dalla-Favera, R., 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat. Rev. Immunol. 8, 22–33.
Klein, U., Dalla-Favera, R., 2010. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Semin. Cancer Biol. 20, 377–383.
Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R., 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J. Exp. Med. 188, 1679–1689.
Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A., Dalla-Favera, R., 2001. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J. Exp. Med. 194, 1625–1638.
Knappe, A., Hör, S., Wittmann, S., Fickenscher, H., 2000. Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. J. Virol. 74, 3881–3887.
Korthäuer, U., Graf, D., Mages, H.W., Brière, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., Levinsky, R.J., Kroczek, R.A., 1993. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature 361, 539–541.
Kotenko, S.V., 2002. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? Cytokine Growth Factor Rev. 13, 223–240.
Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., Pestka, S., 2001. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. J. Biol. Chem. 276, 2725–2732.
Kotenko, S.V., Krause, C.D., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Wu, W., Pestka, S., 1997. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. EMBO J. 16, 5894–5903.
Koutouzov, S., Mathian, A., Dalloul, A., 2006. Type-I interferons and systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev 5, 554–562.

Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., Rajewsky, K., 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. Cell 117, 787–800.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W., 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell 75, 263–274.

Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. Science 254, 707–710.

Kunz, S., Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Doecke, W.-D., Volk, H.-D., Sterry, W., Asadullah, K., Sabat, R., 2006. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. Exp. Dermatol. 15, 991–1004.

Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S., Busslinger, M., 2008. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. Immunity 28, 751–762.

Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., Stryckmans, P., 1998. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. Blood 91, 2387–2396.

Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., Massy, M., Bernier, M., Stryckmans, P., 1997. Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors. Br. J. Haematol. 97, 612–620.

Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A., 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. Physiology (Bethesda) 22, 193–201.

Lampert, I.A., Wotherspoon, A., Van Noorden, S., Hasserjian, R.P., 1999. High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. Hum. Pathol. 30, 648–654.

Lanzavecchia, A., Bernasconi, N., Traggiai, E., Ruprecht, C.R., Corti, D., Sallusto, F., 2006. Understanding and making use of human memory B cells. Immunol. Rev. 211, 303–309.

Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2002. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. Nat. Rev. Immunol. 2, 982–987.

Layton, J.E., Vitetta, E.S., Uhr, J.W., Krammer, P.H., 1984. Clonal analysis of B cells induced to secrete IgG by T cell-derived lymphokine(s). J. Exp. Med. 160, 1850–1863.

Lebedeva, I.V., Sarkar, D., Su, Z.-Z., Kitada, S., Dent, P., Stein, C.A., Reed, J.C., Fisher, P.B., 2003. Bcl-2 and Bcl-x(L) differentially protect human prostate cancer cells from induction of apoptosis by melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24. Oncogene 22, 8758–8773.

Lebedeva, I.V., Su, Z., Chang, Y., Kitada, S., Reed, J.C., Fisher, P.B., 2002. The cancer growth suppressing gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells. Oncogene 21, 708–718.

Lécart, S., Morel, F., Noraz, N., Pène, J., Garcia, M., Boniface, K., Lecron, J.-C., Yssel, H., 2002. IL-22, in contrast to IL-10, does not induce Ig production, due to absence of a functional IL-22 receptor on activated human B cells. Int. Immunol. 14, 1351–1356.

Lee, G.R., Kim, S.T., Spilianakis, C.G., Fields, P.E., Flavell, R.A., 2006. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. Immunity 24, 369–379.

Levy, Y., Brouet, J.C., 1994. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. J. Clin. Invest. 93, 424–428.

Linderson, Y., Eberhard, D., Malin, S., Johansson, A., Busslinger, M., Pettersson, S., 2004. Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. EMBO Rep. 5, 291–296.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., Cerutti, A., 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat. Immunol. 3, 822–829.

Liu, F.-T., Newland, A.C., Jia, L., 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 956–962.

Liu, J., Uematsu, H., Tsuchida, N., Ikeda, M.-A., 2011. Essential role of caspase-8 in p53/p73-dependent apoptosis induced by etoposide in head and neck carcinoma cells. Mol. Cancer 10, 95.

Lopes-Carvalho, T., Foote, J., Kearney, J.F., 2005. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. Curr. Opin. Immunol. 17, 244–250.

Luppi, M., Grazia Ferrari, M., Bonaccorsi, G., Longo, G., Narni, F., Barozzi, P., Marasca, R., Mussini, C., Torelli, G., 1996. Hepatitis C virus infection in subsets of neoplastic lymphoproliferations not associated with cryoglobulinemia. Leukemia 10, 351–355.

Maarof, G., Bouchet-Delbos, L., Gary-Gouy, H., Durand-Gasselin, I., Krzysiek, R., Dalloul, A., 2010. Interleukin-24 inhibits the plasma cell differentiation program in human germinal center B cells. Blood 115, 1718–1726.

Macallan, D.C., Wallace, D.L., Zhang, Y., Ghattas, H., Asquith, B., De Lara, C., Worth, A., Panayiotakopoulos, G., Griffin, G.E., Tough, D.F., Beverley, P.C.L., 2005. B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells. Blood 105, 3633–3640.

Macatonia, S.E., Doherty, T.M., Knight, S.C., O'Garra, A., 1993. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. J. Immunol. 150, 3755–3765.

MacLennan, I., Vinuesa, C., 2002. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. Immunity 17, 235–238.

MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., Vinuesa, C.G., 2003. Extrafollicular antibody responses. Immunol. Rev. 194, 8–18.

Madireddi, M.T., Dent, P., Fisher, P.B., 2000a. AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to mda-7 gene promoter activity during human melanoma differentiation. J. Cell. Physiol. 185, 36–46.

Madireddi, M.T., Dent, P., Fisher, P.B., 2000b. Regulation of mda-7 gene expression during human melanoma differentiation. Oncogene 19, 1362–1368.

Madireddi, M.T., Su, Z.Z., Young, C.S., Goldstein, N.I., Fisher, P.B., 2000c. Mda-7, a novel melanoma differentiation associated gene with promise for cancer gene therapy. Adv. Exp. Med. Biol. 465, 239–261.

Manser, T., 2004. Textbook germinal centers? J. Immunol. 172, 3369–3375.

Manson, J.J., Mauri, C., Ehrenstein, M.R., 2005. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. Springer Semin. Immunopathol. 26, 425–432.

Mantovani, A., Bussolino, F., Dejana, E., 1992. Cytokine regulation of endothelial cell function. FASEB J. 6, 2591–2599.

Mantovani, A., Garlanda, C., Introna, M., Vecchi, A., 1998. Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. Transplant. Proc. 30, 4239–4243.

Manz, R.A., Hauser, A.E., Hiepe, F., Radbruch, A., 2005. Maintenance of serum antibody levels. Annu. Rev. Immunol. 23, 367–386.

Manz, R.A., Radbruch, A., 2002. Plasma cells for a lifetime? Eur. J. Immunol. 32, 923–927.

Marti, G.E., Faguet, G., Bertin, P., Agee, J., Washington, G., Ruiz, S., Carter, P., Zenger, V., Vogt, R., Noguchi, P., 1992. CD20 and CD5 expression in B-chronic lymphocytic leukemia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 651, 480–483.

Mathian, A., Gallegos, M., Pascual, V., Banchereau, J., Koutouzov, S., 2011. Interferon-α induces unabated production of short-lived plasma cells in pre-autoimmune lupus-prone (NZB×NZW)F1 mice but not in BALB/c mice. Eur. J. Immunol. 41, 863–872.

Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M., 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. Science 312, 1650–1653.

McHeyzer-Williams, L.J., Driver, D.J., McHeyzer-Williams, M.G., 2001. Germinal center reaction. Curr. Opin. Hematol. 8, 52–59.

McHeyzer-Williams, L.J., Malherbe, L.P., McHeyzer-Williams, M.G., 2006. Checkpoints in memory B-cell evolution. Immunol. Rev. 211, 255–268.

McHeyzer-Williams, L.J., McHeyzer-Williams, M.G., 2005a. Antigen-specific memory B cell development. Annu. Rev. Immunol. 23, 487–513.

McHeyzer-Williams, L.J., McHeyzer-Williams, M.G., 2005b. Antigen-specific memory B cell development. Annu. Rev. Immunol. 23, 487–513.

McHeyzer-Williams, M.G., 2003. B cells as effectors. Curr. Opin. Immunol. 15, 354–361.

McIntyre, T.M., Klinman, D.R., Rothman, P., Lugo, M., Dasch, J.R., Mond, J.J., Snapper, C.M., 1993. Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. J. Exp. Med. 177, 1031–1037.

Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., Brieva, J.A., 2002. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. Blood 99, 2154–2161.

Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., Busslinger, M., 2011. Pax5: a master regulator of B cell development and leukemogenesis. Adv. Immunol. 111, 179–206.

Meffre, E., Wardemann, H., 2008. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. Curr. Opin. Immunol. 20, 632–638.

Mendelson, K.G., Contois, L.R., Tevosian, S.G., Davis, R.J., Paulson, K.E., 1996. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 12908–12913.

Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R.N., Wasil, T., Rai, K.R., Hellerstein, M.K., Chiorazzi, N., 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. J. Clin. Invest. 115, 755–764.

Messmer, U.K., Pfeilschifter, J., 2000. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. Bioessays 22, 878–881.

Mhashilkar, A.M., Schrock, R.D., Hindi, M., Liao, J., Sieger, K., Kourouma, F., Zou-Yang, X.H., Onishi, E., Takh, O., Vedvick, T.S., Fanger, G., Stewart, L., Watson, G.J., Snary, D., Fisher, P.B., Saeki, T., Roth, J.A., Ramesh, R., Chada, S., 2001. Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel anti-tumor gene for cancer gene therapy. Mol. Med. 7, 271–282.

Miller, J.F., 1999. Discovering the origins of immunological competence. Annu. Rev. Immunol. 17, 1–17.

Miller, J.F., Mitchell, G.F., 1968. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128, 801–820.

Mitchell, G.C., Fillinger, J.L., Sittadjody, S., Avila, J.L., Burd, R., Limesand, K.H., 2010. IGF1 activates cell cycle arrest following irradiation by reducing binding of ΔNp63 to the p21 promoter. Cell Death Dis 1, e50.

Mitchell, G.F., Miller, J.F., 1968. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. J. Exp. Med. 128, 821–837.

Mitchison, N.A., 2004. T-cell-B-cell cooperation. Nat. Rev. Immunol. 4, 308–312.

Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Anderson, K.C., 2002. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. Oncogene 21, 5673–5683.

Miyasaka, M., Tanaka, T., 2004. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. Nat. Rev. Immunol. 4, 360–370.

Mizoguchi, C., Uehara, S., Akira, S., Takatsu, K., 1999. IL-5 induces IgG1 isotype switch recombination in mouse CD38-activated sIgD-positive B lymphocytes. J. Immunol. 162, 2812–2819.

Mond, J.J., Lees, A., Snapper, C.M., 1995. T cell-independent antigens type 2. Annu. Rev. Immunol. 13, 655–692.

Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstine, M.L., Khan, T.A., Mosmann, T.R., 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. Science 248, 1230–1234.

Moser, K., Tokoyoda, K., Radbruch, A., MacLennan, I., Manz, R.A., 2006. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. Curr. Opin. Immunol. 18, 265–270.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell 102, 553–563.

Murray, P.J., Young, R.A., 1999. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. Infect. Immun. 67, 3087–3095.

Murugaiyan, G., Mittal, A., Lopez-Diego, R., Maier, L.M., Anderson, D.E., Weiner, H.L., 2009. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. J. Immunol. 183, 2435–2443.

Nagalakshmi, M.L., Murphy, E., McClanahan, T., De Waal Malefyt, R., 2004. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. Int. Immunopharmacol. 4, 577–592.

Nagasawa, T., 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. Nat. Rev. Immunol. 6, 107–116.

Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol. Cell 7, 683–694.

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., Leonard, W.J., 2008. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. Cell 73: 147-157. 1993. J. Immunol. 181, 5817–5827.

Nossal, G.J.V., 2002. One cell, one antibody: prelude and aftermath. Immunol. Rev. 185, 15–23.

Notarangelo, L.D., Lanzi, G., Peron, S., Durandy, A., 2006. Defects of class-switch recombination. J. Allergy Clin. Immunol. 117, 855–864.

Nückel, H., Rebmann, V., Dürig, J., Dührsen, U., Grosse-Wilde, H., 2005. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. Blood 105, 1694–1698.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., Dong, C., 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. Immunity 29, 138–149.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., Dong, C., 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. Science 325, 1001–1005.

O'Connor, B.P., Gleeson, M.W., Noelle, R.J., Erickson, L.D., 2003. The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. Immunol. Rev. 194, 61–76.

O'Garra, A., Stapleton, G., Dhar, V., Pearce, M., Schumacher, J., Rugo, H., Barbis, D., Stall, A., Cupp, J., Moore, K., 1990. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. Int. Immunol. 2, 821–832.

Obukhanych, T.V., Nussenzweig, M.C., 2006. T-independent type II immune responses generate memory B cells. J. Exp. Med. 203, 305–310.

Ohtsuka, T., Buchsbaum, D., Oliver, P., Makhija, S., Kimberly, R., Zhou, T., 2003. Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. Oncogene 22, 2034–2044.

Okada, T., Cyster, J.G., 2006. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. Curr. Opin. Immunol. 18, 278–285.

Okamura, S., Ng, C.C., Koyama, K., Takei, Y., Arakawa, H., Monden, M., Nakamura, Y., 1999. Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. Oncol. Res. 11, 281–285.

Ollila, J., Vihinen, M., 2005. B cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 518–523.

Ooi, J.D., Phoon, R.K.S., Holdsworth, S.R., Kitching, A.R., 2009. IL-23, not IL-12, directs autoimmunity to the Goodpasture antigen. J. Am. Soc. Nephrol. 20, 980–989.

Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J., 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. Nat. Immunol. 4, 410–415.

Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L., Hoffbrand, A.V., 1996. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. Br. J. Haematol. 92, 97–103.

Park, C.-S., Choi, Y.S., 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? Immunology 114, 2–10.

Parrish-Novak, J., Xu, W., Brender, T., Yao, L., Jones, C., West, J., Brandt, C., Jelinek, L., Madden, K., McKernan, P.A., Foster, D.C., Jaspers, S., Chandrasekher, Y.A., 2002. Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. J. Biol. Chem. 277, 47517–47523.

Pataer, A., Vorburger, S.A., Barber, G.N., Chada, S., Mhashilkar, A.M., Zou-Yang, H., Stewart, A.L., Balachandran, S., Roth, J.A., Hunt, K.K., Swisher, S.G., 2002. Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). Cancer Res. 62, 2239–2243.

Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., Brink, R., 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. J. Exp. Med. 203, 1081–1091.

Pedersen, I.M., Kitada, S., Leoni, L.M., Zapata, J.M., Karras, J.G., Tsukada, N., Kipps, T.J., Choi, Y.S., Bennett, F., Reed, J.C., 2002. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. Blood 100, 1795–1801.

Péguet-Navarro, J., Moulon, C., Caux, C., Dalbiez-Gauthier, C., Banchereau, J., Schmitt, D., 1994. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. Eur. J. Immunol. 24, 884–891.

Pelanda, R., Torres, R.M., 2006. Receptor editing for better or for worse. Curr. Opin. Immunol. 18, 184–190.

Peng, S.L., 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. Curr. Opin. Immunol. 17, 230–236.

Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W.G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R.F., Jr, Marti, G.E., Rawstron, A.C., Van Zelm, M.C., Van Dongen, J.J.M., Johnsen, H.E., Klein, B., Orfao, A., 2010. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. Cytometry B Clin Cytom 78 Suppl 1, S47–60.

Peschke, T., Bender, A., Nain, M., Gemsa, D., 1993. Role of macrophage cytokines in influenza A virus infections. Immunobiology 189, 340–355.

Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H., Palucka, A.K., Banchereau, J., 2006. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. Blood 107, 2613–2618.

Poindexter, N.J., Walch, E.T., Chada, S., Grimm, E.A., 2005. Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. J. Leukoc. Biol. 78, 745–752.

Preud'homme, J.L., Seligmann, M., 1972. Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative diseases. Blood 40, 777–794.

Pulendran, B., Ahmed, R., 2006. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. Cell 124, 849–863.

Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y.C., Germain, R.N., 2006. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. Science 312, 1672–1676.

Qiang, Y.-W., Kopantzev, E., Rudikoff, S., 2002. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. Blood 99, 4138–4146.

Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S., 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 46, 219–234.

Ramírez, J., Lukin, K., Hagman, J., 2010. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. Curr. Opin. Immunol. 22, 177–184.

Ranheim, E.A., Cantwell, M.J., Kipps, T.J., 1995. Expression of CD27 and its ligand, CD70, on chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood 85, 3556–3565.

Raval, A., Tanner, S.M., Byrd, J.C., Angerman, E.B., Perko, J.D., Chen, S.-S., Hackanson, B., Grever, M.R., Lucas, D.M., Matkovic, J.J., Lin, T.S., Kipps, T.J., Murray, F., Weisenburger, D., Sanger, W., Lynch, J., Watson, P., Jansen, M., Yoshinaga, Y., Rosenquist, R., De Jong, P.J., Coggill, P., Beck, S., Lynch, H., De la Chapelle, A., Plass, C., 2007. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. Cell 129, 879–890.

Raveche, E.S., Salerno, E., Scaglione, B.J., Manohar, V., Abbasi, F., Lin, Y.-C., Fredrickson, T., Landgraf, P., Ramachandra, S., Huppi, K., Toro, J.R., Zenger, V.E., Metcalf, R.A., Marti, G.E., 2007. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. Blood 109, 5079–5086.

Rawstron, A., Hillmen, P., Houlston, R., 2004. Clonal lymphocytes in persons without known chronic lymphocytic leukemia (CLL): implications of recent findings in family members of CLL patients. Semin. Hematol. 41, 192–200.

Razanajaona, D., Van Kooten, C., Lebecque, S., Bridon, J.M., Ho, S., Smith, S., Callard, R., Banchereau, J., Brière, F., 1996. Somatic mutations in human Ig variable genes correlate with a partially functional CD40-ligand in the X-linked hyper-IgM syndrome. J. Immunol. 157, 1492–1498.

Redaelli, A., Laskin, B.L., Stephens, J.M., Botteman, M.F., Pashos, C.L., 2004. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. Eur J Cancer Care (Engl) 13, 279–287.

Reljic, R., Wagner, S.D., Peakman, L.J., Fearon, D.T., 2000. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. J. Exp. Med. 192, 1841–1848.

Renauld, J.-C., 2003. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. Nat. Rev. Immunol. 3, 667–676.

Renshaw, B.R., Fanslow, W.C., 3rd, Armitage, R.J., Campbell, K.A., Liggitt, D., Wright, B., Davison, B.L., Maliszewski, C.R., 1994. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. J. Exp. Med. 180, 1889–1900.

Riley, J.K., Takeda, K., Akira, S., Schreiber, R.D., 1999. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. J. Biol. Chem. 274, 16513–16521.

Roitt, I.M., Greaves, M.F., Torrigiani, G., Brostoff, J., Playfair, J.H., 1969. The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. Lancet 2, 367–371.

Rømer, J., Hasselager, E., Nørby, P.L., Steiniche, T., Thorn Clausen, J., Kragballe, K., 2003. Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol. J. Invest. Dermatol. 121, 1306–1311.

Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J.C., Grever, M.R., Cheson, B.D., Chiorazzi, N., Wilson, W.H., Kipps, T.J., Brown, P.O., Staudt, L.M., 2001. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J. Exp. Med. 194, 1639–1647.

Rossi, E., Matutes, E., Morilla, R., Owusu-Ankomah, K., Heffernan, A.M., Catovsky, D., 1996. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 10, 494–497.

Saeki, T., Mhashilkar, A., Swanson, X., Zou-Yang, X.H., Sieger, K., Kawabe, S., Branch, C.D., Zumstein, L., Meyn, R.E., Roth, J.A., Chada, S., Ramesh, R., 2002. Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression in vivo. Oncogene 21, 4558–4566.

Sagaert, X., De Wolf-Peeters, C., 2003. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. Immunol. Lett. 90, 179–186.

Sainz-Perez, A., Gary-Gouy, H., Gaudin, F., Maarof, G., Marfaing-Koka, A., De Revel, T., Dalloul, A., 2008. IL-24 induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells engaged into the cell cycle through dephosphorylation of STAT3 and stabilization of p53 expression. J. Immunol. 181, 6051–6060.

Sainz-Perez, A., Gary-Gouy, H., Portier, A., Davi, F., Merle-Beral, H., Galanaud, P., Dalloul, A., 2006. High Mda-7 expression promotes malignant cell survival and p38 MAP kinase activation in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 20, 498–504.

Salsano, F., Froland, S.S., Natvig, J.B., Michaelsen, T.E., 1974. Same idiotype of B-lymphocyte membrane IgD and IgM. Formal evidence for monoclonality of chronic lymphocytic leukemia cells. Scand. J. Immunol. 3, 841–846.

Sarkar, D., Su, Z., Lebedeva, I.V., Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Dent, P., Fisher, P.B., 2002a. mda-7 (IL-24): signaling and functional roles. BioTechniques Suppl, 30–39.

Sarkar, D., Su, Z.-Z., Lebedeva, I.V., Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Valerie, K., Dent, P., Fisher, P.B., 2002b. mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 10054–10059.

Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Lebedeva, I., Mei, M.X., Sarkar, D., Su, Z.-Z., Kang, D.-C., Dent, P., Pestka, S., Fisher, P.B., 2003a. Mda-7/IL-24 induces apoptosis of diverse cancer cell lines through JAK/STAT-independent pathways. J. Cell. Physiol. 196, 334–345.

Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Sarkar, D., Su, Z.Z., Lebedeva, I.V., Dent, P., Pestka, S., Fisher, P.B., 2003b. MDA-7/IL-24: novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine. Cytokine Growth Factor Rev. 14, 35–51.

Schaefer, G., Venkataraman, C., Schindler, U., 2001. Cutting edge: FISP (IL-4-induced secreted protein), a novel cytokine-like molecule secreted by Th2 cells. J. Immunol. 166, 5859–5863.

Scheeren, F.A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., Gimeno, R., Vyth-Dreese, F.A., Blom, B., Spits, H., 2005. STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. Nat. Immunol. 6, 303–313.

Schimmer, A.D., Munk-Pedersen, I., Minden, M.D., Reed, J.C., 2003. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. Curr Treat Options Oncol 4, 211–218.

Schlesinger, M., Broman, I., Lugassy, G., 1996. The complement system is defective in chronic lymphatic leukemia patients and in their healthy relatives. Leukemia 10, 1509–1513.

Schneider, P., 2005. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. Curr. Opin. Immunol. 17, 282–289.

Schroer, K.R., Briles, D.E., Van Boxel, J.A., Davie, J.M., 1974. Idiotypic uniformity of cell surface immunoglobulin in chronic lymphocytic leukeima. Evidence for monoclonal proliferation. J. Exp. Med. 140, 1416–1420.

Sen, F., Lai, R., Albitar, M., 2002. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;18) and trisomy 12. Arch. Pathol. Lab. Med. 126, 1543–1546.

Sewnath, M.E., Olszyna, D.P., Birjmohun, R., Ten Kate, F.J., Gouma, D.J., Van Der Poll, T., 2001. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during Escherichia coli peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. J. Immunol. 166, 6323–6331.

Shah, A.R., Maeda, K., Deegan, M.J., Roth, M.S., Schnitzer, B., 1992. A clinicopathologic study of familial chronic lymphocytic leukemia. Am. J. Clin. Pathol. 97, 184–188.

Shapiro-Shelef, M., Calame, K., 2005. Regulation of plasma-cell development. Nat. Rev. Immunol. 5, 230–242.

Shparago, N., Zelazowski, P., Jin, L., McIntyre, T.M., Stuber, E., Peçanha, L.M., Kehry, M.R., Mond, J.J., Max, E.E., Snapper, C.M., 1996. IL-10 selectively regulates murine Ig isotype switching. Int. Immunol. 8, 781–790.

Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., Lipsky, P.E., 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood 105, 4390–4398.

Siu, W.P., Pun, P.B.L., Latchoumycandane, C., Boelsterli, U.A., 2008. Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac-induced hepatocyte injury: Multiple protective roles of cyclosporin A. Toxicol. Appl. Pharmacol. 227, 451–461.

Sjöberg, J., Aguilar-Santelises, M., Sjögren, A.M., Pisa, E.K., Ljungdahl, A., Björkholm, M., Jondal, M., Mellstedt, H., Pisa, P., 1996. Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease. Br. J. Haematol. 92, 393–400.

Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., Ahmed, R., 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity 8, 363–372.

Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr, 1994. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science 266, 1376–1380.

Song, H., Cerny, J., 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. J. Exp. Med. 198, 1923–1935.

Soo, C., Shaw, W.W., Freymiller, E., Longaker, M.T., Bertolami, C.N., Chiu, R., Tieu, A., Ting, K., 1999. Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. J. Cell. Biochem. 74, 1–10.

Sozzani, S., Ghezzi, S., Iannolo, G., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Sica, A., Locati, M., Mackay, C., Wells, T.N., Biswas, P., Vicenzi, E., Poli, G., Mantovani, A., 1998. Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. J. Exp. Med. 187, 439–444.

Spaner, D.E., Lee, E., Shi, Y., Wen, F., Li, Y., Tung, S., McCaw, L., Wong, K., Gary-Gouy, H., Dalloul, A., Ceddia, R., Gorzcynski, R., 2012. PPAR-alpha is a therapeutic target for chronic lymphocytic leukemia. Leukemia.

Sprenger, H., Meyer, R.G., Kaufmann, A., Bussfeld, D., Rischkowsky, E., Gemsa, D., 1996. Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. J. Exp. Med. 184, 1191–1196.

Srivastava, B., Lindsley, R.C., Nikbakht, N., Allman, D., 2005. Models for peripheral B cell development and homeostasis. Semin. Immunol. 17, 175–182.

Stavnezer, J., 2000. Molecular processes that regulate class switching. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 245, 127–168.

Stein, J.V., Nombela-Arrieta, C., 2005. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. Immunology 116, 1–12.

Stetson, D.B., Voehringer, D., Grogan, J.L., Xu, M., Reinhardt, R.L., Scheu, S., Kelly, B.L., Locksley, R.M., 2004. Th2 cells: orchestrating barrier immunity. Adv. Immunol. 83, 163–189.

Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., Rawlings, D.J., 2004. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. Immunol. Rev. 197, 161–178.

Su, Z., Lebedeva, I.V., Gopalkrishnan, R.V., Goldstein, N.I., Stein, C.A., Reed, J.C., Dent, P., Fisher, P.B., 2001. A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 10332–10337.

Su, Z.-Z., Lebedeva, I.V., Sarkar, D., Gopalkrishnan, R.V., Sauane, M., Sigmon, C., Yacoub, A., Valerie, K., Dent, P., Fisher, P.B., 2003. Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and

radiosensitization in malignant gliomas in a p53-independent manner. Oncogene 22, 1164–1180.
Sze, D.M., Toellner, K.M., García de Vinuesa, C., Taylor, D.R., MacLennan, I.C., 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. J. Exp. Med. 192, 813–821.
Takayama, T., Morelli, A.E., Onai, N., Hirao, M., Matsushima, K., Tahara, H., Thomson, A.W., 2001. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. J. Immunol. 166, 7136–7143.
Tamura, K., Sawada, H., Izumi, Y., Fukuda, T., Utsunomiya, A., Ikeda, S., Uike, N., Tsukada, J., Kawano, F., Shibuya, T., Gondo, H., Okamura, S., Suzumiya, J., 2001. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan. Eur. J. Haematol. 67, 152–157.
Tangye, S.G., Hodgkin, P.D., 2004. Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses. Immunology 112, 509–520.
Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., De Vries, J.E., 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. J. Exp. Med. 188, 1691–1703.
Tonnelle, C., Dijon, M., Moreau, T., Garulli, C., Bardin, F., Chabannon, C., 2009. Stage specific over-expression of the dominant negative Ikaros 6 reveals distinct role of Ikaros throughout human B-cell differentiation. Mol. Immunol. 46, 1736–1743.
Tournoy, K.G., Kips, J.C., Pauwels, R.A., 2000. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. Clin. Exp. Allergy 30, 775–783.
Traggiai, E., Puzone, R., Lanzavecchia, A., 2003. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. Vaccine 21 Suppl 2, S35–37.
Trinchieri, G., 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. J. Exp. Med. 204, 239–243.
Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., Wardemann, H., 2006. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. J. Exp. Med. 203, 393–400.
Tsukada, N., Burger, J.A., Zvaifler, N.J., Kipps, T.J., 2002. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. Blood 99, 1030–1037.
Tussiwand, R., Bosco, N., Ceredig, R., Rolink, A.G., 2009. Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. Eur. J. Immunol. 39, 2317–2324.
Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Wagner, R.D., Warner, T., Balish, E., 1999. Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. Infect. Immun. 67, 670–674.
Veenstra, H., Jacobs, P., Dowdle, E.B., 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. Cell. Immunol. 171, 68–73.
Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., Jacks, T., 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature 445, 661–665.
Vilagos, B., Hoffmann, M., Souabni, A., Sun, Q., Werner, B., Medvedovic, J., Bilic, I., Minnich, M., Axelsson, E., Jaritz, M., Busslinger, M., 2012. Essential role of EBF1 in the generation and function of distinct mature B cell types. J. Exp. Med. 209, 775–792.

Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Goodnow, C.C., Randall, K.L., 2010. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. Immunol. Rev. 237, 72–89.

Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., Mackay, C.R., 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. Nat. Rev. Immunol. 5, 853–865.

Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R., King, C., 2008. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. Immunity 29, 127–137.

Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.Q., Snapper, C.M., Mond, J.J., 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. Immunol. Rev. 176, 154–170.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.-P., Cottrez, F., Groux, H., 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. Immunity 18, 605–617.

Wallach, D., Kang, T.-B., Kovalenko, A., 2008. The extrinsic cell death pathway and the élan mortel. Cell Death Differ. 15, 1533–1541.

Wang, L., Du, F., Wang, X., 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. Cell 133, 693–703.

Wang, M., Liang, P., 2005. Interleukin-24 and its receptors. Immunology 114, 166–170.

Wang, M., Tan, Z., Zhang, R., Kotenko, S.V., Liang, P., 2002. Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. J. Biol. Chem. 277, 7341–7347.

Weintraub, A., 2003. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. Carbohydr. Res. 338, 2539–2547.

Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist F, F., De Saint Basile G, G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., Weill, J.C., 2001. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 1166–1170.

Welsh, R.M., Selin, L.K., Szomolanyi-Tsuda, E., 2004. Immunological memory to viral infections. Annu. Rev. Immunol. 22, 711–743.

Wen, X.Y., Stewart, A.K., Sooknanan, R.R., Henderson, G., Hawley, T.S., Reimold, A.M., Glimcher, L.H., Baumann, H., Malek, L.T., Hawley, R.G., 1999. Identification of c-myc promoter-binding protein and X-box binding protein 1 as interleukin-6 target genes in human multiple myeloma cells. Int. J. Oncol. 15, 173–178.

Willems, F., Marchant, A., Delville, J.P., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., De Boer, M., Goldman, M., 1994. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. Eur. J. Immunol. 24, 1007–1009.

Winkelstein, A., Jordan, P.S., 1992. Immune deficiencies in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. Clin Rev Allergy 10, 39–58.

Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., Sabat, R., 2002. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? J. Immunol. 168, 5397–5402.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., Sabat, R., 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity 21, 241–254.

Wolniak, K.L., Shinall, S.M., Waldschmidt, T.J., 2004. The germinal center response. Crit. Rev. Immunol. 24, 39–65.

Xie, M.H., Aggarwal, S., Ho, W.H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., Gurney, A.L., 2000. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. J. Biol. Chem. 275, 31335–31339.

Yang, X., Gartner, J., Zhu, L., Wang, S., Brunham, R.C., 1999. IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following Chlamydia trachomatis lung infection. J. Immunol. 162, 1010–1017.

Yoshida, T., Ng, S.Y.-M., Zuniga-Pflucker, J.C., Georgopoulos, K., 2006. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. Nat. Immunol. 7, 382–391.

Yuan, J., Kroemer, G., 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. Genes Dev. 24, 2592–2602.

Yuille, M.R., Matutes, E., Marossy, A., Hilditch, B., Catovsky, D., Houlston, R.S., 2000. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. Br. J. Haematol. 109, 794–799.

Yurasov, S., Hammersen, J., Tiller, T., Tsuiji, M., Wardemann, H., 2005. B-cell tolerance checkpoints in healthy humans and patients with systemic lupus erythematosus. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1062, 165–174.

Zapf, J., Hauri, C., Waldvogel, M., Futo, E., Häsler, H., Binz, K., Guler, H.P., Schmid, C., Froesch, E.R., 1989. Recombinant human insulin-like growth factor I induces its own specific carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 3813–3817.

Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr, 1994. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene 9, 3743–3751.

Zhang, R., Tan, Z., Liang, P., 2000. Identification of a novel ligand-receptor pair constitutively activated by ras oncogenes. J. Biol. Chem. 275, 24436–24443.