

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE**

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE
présenté par

Laurence BOUCHET-DELBOS

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**Caractérisation d'un modèle murin du Syndrome WHIM
(Souris *Cxcr4*⁺¹⁰¹³)**

Soutenu le 3 Novembre 2011

devant le jury suivant:

Dr Bettaieb Ali – Président
Dr Balabanian Karl – Tuteur scientifique
Dr Canque Bruno – Tuteur pédagogique
Dr Bourgeois Christine – Rapporteur
Dr Walzer Thierry – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Karl Balabanian
UMR_S 996 « Cytokine, Chimiokine et Immunopathologie »
Equipe 4 : La chimiokine SDF1/CXCL12 et ses récepteurs en Immunopathologie
32, rue des carnets
92140 Clamart

Et de :

Dr Bruno Canque
INSERM U944/ UMR Paris 7/CNRS 7212
Laboratoire Développement du Système immunitaire
Institut Universitaire d'Hématologie (IUH)
Centre Hayem
1, avenue Claude Vellefaux
75475 Paris cedex 10

ECOLE PRATIQUES DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

**CARACTERISATION D'UN MODELE MURIN DU SYNDROME WHIM
(Souris *Cxcr4*⁺¹⁰¹³)**

Laurence BOUCHET-DELBOS

Soutenu le 3 Novembre 2011

Résumé

Le **syndrome WHIM** (SW) est une maladie immuno-hématologique rare de transmission autosomique dominante qui se caractérise par une abondance de verrues (**W**, Warts) liées à des infections récurrentes par le virus du Papillome humain, une hypogammaglobulinémie (**H**), des infections bactériennes à répétition (**I**) et une rétention anormale de neutrophiles hypermatures dans la moelle osseuse (**M**, Myélokathexie). Ce tableau clinique est invariablement associé à une leucopénie circulante qui affecte un grand nombre de populations leucocytaires. Le SW se caractérise également par une hétérogénéité génétique : les patients sont porteurs ou non d'une mutation hétérozygote du gène codant pour CXCR4. Ils partagent un gain de fonction de ce récepteur qui se manifeste par un défaut de désensibilisation de CXCR4 et une hypersensibilité à son ligand CXCL12. Les conséquences *in vivo* de l'hyperactivité du CXCR4 muté ne pouvant être appréhendées chez l'homme, nous avons généré, selon une stratégie de *Knock In*, un modèle murin hétérozygote pour la mutation de Cxcr4 en position 1013.

Chez les souris ainsi obtenues (souris $Cxcr4^{+/1013}$), l'expression membranaire de Cxcr4 est préservée et nous avons observé une leucopénie profonde et un gain de fonction du récepteur. Ceci nous a permis d'identifier ces souris comme un modèle leucopénique du SW. Nous avons ensuite étudié dans quelle mesure le gain de fonction de Cxcr4 muté affecte les processus de thymopoïèse, de lymphopoïèse B et de granulopoïèse. Ainsi, nous avons pu montrer que l'hyperactivité du récepteur muté altère la lymphopoïèse B et T, et qu'elle perturbe le trafic des leucocytes dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, la rate présente une forte hypoplasie qui s'accompagne d'une diminution aussi bien des lymphocytes B (LB) et T (LT), alors que nous avons observé une hyperplasie ganglionnaire qui se caractérise par une augmentation très importante des LB et LT, et s'accompagne d'une désorganisation de l'architecture ganglionnaire. Ainsi, la lymphopénie circulante pourrait s'expliquer par une diminution de production des lymphocytes et une altération du trafic périphérique de ces cellules dans les tissus lymphoïdes secondaires. Enfin, l'administration à ce modèle murin d'un antagoniste de CXCR4, l'AMD3100, a permis de corriger la lympho-neutropénie circulante, offrant une nouvelle piste thérapeutique.

Le modèle murin $Cxcr4^{+/1013}$ offre de nombreuses perspectives pour la compréhension des mécanismes moléculaires du gain de fonction du récepteur muté, notamment des interactions de CXCR4 avec ses partenaires intracellulaire (ex : GRK3). Il sera également utilisé pour tester l'efficacité et la tolérance à long terme de molécules capables d'empêcher l'induction de voies de signalisation *via* CXCR4 afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques plus spécifiques du SW.

Mots clés : Syndrome WHIM, modèle murin, CXCR4, lympho-neutropénie, gain de fonction

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| a- CXCR4 | p12 |
| - Généralités | p12 |
| - Expression de CXCR4 | p12 |
| - Structure | p12 |
| b- CXCL12/SDF-1 | p13 |
| c- Rôle du couple CXCL12/CXCR4 | p13 |
| - Rôle majeur dans l'hématopoïèse | p13 |
| - Maintien de l'homéostasie du trafic leucocytaire | p15 |
| - Implication dans certains processus pathologiques périphériques | p16 |
| B- Voies de signalisation de CXCR4 | p17 |
| a- Voies dépendantes des protéines G | p17 |
| b- Voies indépendantes des protéines G | p17 |
| C- Régulation de l'expression de CXCR4 : | p19 |
| a- Régulation transcriptionnelle de CXCR4 | p19 |
| b- Régulation de l'expression de la protéine CXCR4 | p20 |
| c- Oligomérisation | p20 |
| D- Régulation de l'activation de CXCR4 | p21 |
| a- Régulation de la fixation de CXCL12 | p21 |
| - Régulation négative | p21 |
| - Régulation positive | p21 |
| b- Régulation des voies dépendantes et indépendantes des protéines G | p22 |
| E- Régulation des signaux | p22 |
| a- La désensibilisation | p22 |
| b- L'internalisation | p24 |
| c- La dégradation | p24 |
| F- Dérégulation de CXCR4 : cas du Syndrome WHIM | p25 |
| a- Définition clinique du Syndrome WHIM | p25 |
| b- Implication de CXCR4 dans le SW : défaut d'inactivation de CXCR4 | p26 |
| c- Altération du système GRK/ β -arr dans le SW | p27 |

Abréviations

Ac : Anticorps

ADN: Acide desoxyribonucleique

aLN : Ganglions axillaires

BEC: Boucle extracellulaire

BIC: Boucle intracellulaire

BSA: Bovine Serum Albumin

C-ter : Carboxy-terminal

DN : Double négatif

DP : Double positif

FO : Lymphocytes B folliculaires

GRK: G Protein-Coupled Receptor Kinase

Ig : Immunoglobuline

iLN : Ganglions inguinaux

Int : Intermédiaire

LB : Lymphocytes B

LT : Lymphocytes T

MO : Moelle osseuse

MZ : Lymphocytes B de la zone marginale

NK : Lymphocytes Natural Killer

N-ter : Amino-terminal

OL: Organe lymphoïde

pb : Paires de base

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

RCK : Récepteur de chimiokine

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

rpm: tour/mn

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

S1P: Sphingosin-1-phosphate

S1P1 et S1P5: Récepteur 1 et 5 de S1P

SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor I

SP4 ou SP8 : Simple positif CD4+ ou CD8+

SW : Syndrome WHIM

T1/ T2 : Lymphocytes B transitoires 1/ transitoires 2

WHIM^m : génotype muté $CXCR4^+/CXCR4^{1013}$

WHIM^s : génotype sauvage $CXCR4^+/CXCR4^+$

β -arr : β -arrestine

INTRODUCTION

A- CXCR4 et son ligand CXCL12/SDF-1 :

a- CXCR4:

- Généralités :

CXCR4, appelé aussi FUSIN ou CD184 chez la souris, appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Le gène codant pour CXCR4 a été cloné et localisé sur le chromosome 2 chez l'homme en 1993, puis sur le chromosome 1 chez la souris. Initialement, CXCR4 a été décrit comme étant un cofacteur permettant l'entrée du VIH-1 dans les cellules en association avec la molécule CD4 (Feng Y *et al.*, 1996).

Comme tous les récepteurs CXC avec lesquels il partage une homologie de séquence (32 à 38%), il est couplé aux protéines G hétérotrimériques sensibles aux effets inhibiteurs de la toxine *Bordetella Pertussis* (Hamm HE, 2004). Il possède un ligand unique: la chimiokine CXCL12/SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor I) (Oberlin E *et al.*, 1996), il s'agit donc un récepteur de chimiokine (RCK). Il est largement conservé entre les espèces (Lazarini F *et al.*,

2000, Pillarisetti K *et al.*, 2001).

- Expression de CXCR4 :

Le profil d'expression de CXCR4 est large et très hétérogène. Les ARN messagers de CXCR4 sont abondamment représentés dans les tissus hématopoïétiques et dans les organes non-hématopoïétiques comme le poumon, le cœur (Federspiel B *et al.*, 1993) et le cerveau (Hesseltger J *et al.*, 1999).

Les deux isoformes de CXCR4, A et B, coexistent naturellement à la surface de nombreuses sous-populations leucocytaires telles que les lymphocytes T (LT) (exemple des thymocytes), les lymphocytes B (LB), les macrophages et les cellules polynucléaires (Heesen M *et al.*, 1997). Les deux isoformes sont également exprimées à la surface des cellules non lymphoïdes telles que les cellules épithéliales et endothéliales et les cellules du système nerveux central. Elles sont exprimées aussi par les types cellulaires présents au niveau des sites stratégiques de passage du VIH tels que les muqueuses génitales et digestives, les glandes salivaires, le placenta et le système nerveux central.

- Structure de CXCR4 :

Le récepteur CXCR4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires. Il possède 3 boucles extracellulaires (BEC) et un domaine amino-terminal (N-ter) où s'effectue la liaison du ligand (principalement sur le domaine N-ter et la seconde boucle (BEC II)). Les 3 boucles intracellulaires (BIC) sont responsables de l'activation des voies de signalisation (2), et le domaine carboxy-terminal (C-ter) est impliqué dans la désensibilisation du récepteur.

b- CXCL12/SDF-1 :

En 1994, le gène *Sdf-1* (Stromal cell-derived factor-1) a été cloné chez la souris à partir d'une banque d'ADN complémentaires issue de lignées de cellules stromales de moelle osseuse (MO) (Nagasawa T *et al.*, 1994). Le produit de ce gène a été initialement identifié comme un facteur de croissance des lymphocytes pré-B *in vitro* (Nagasawa T *et al.*, 1996). En 1996, la forme humaine a été clonée sur la base de la séquence murine et identifiée comme le ligand naturel de CXCR4 (ligand doté de propriétés anti-virales) (Bleul CC *et al.*, 1996a). En 2005, il a été montré que CXCL12 se fixe à un second récepteur de type CXC appelé CXCR7 (Balabanian K *et al.*, 2005).

CXCL12 s'exprime de façon constitutive dans les tissus lymphoïdes primaires et secondaires (Casamayor-Pallejà M *et al.*, 2001) mais également dans les tissus non lymphoïdes (Pablos JL *et al.*, 1999). Elle est aussi détectée dans un grand nombre de tissus chez l'embryon murin, la souris adulte et l'homme (Nagasawa T *et al.*, 1996). Chez le fœtus, CXCL12 est produite par les cellules épithéliales biliaires et les cellules mésothéliales des

cavités cœlomiques (Coulomb-L'Hermin A *et al.*, 1999). Toutes ces observations suggèrent que CXCL12 est impliquée dans les fonctions essentielles du développement.

CXCL12 exerce un très grand pouvoir chimioattractant sur les lymphocytes et les monocytes et serait donc impliquée dans la migration trans-endothéliale de ces cellules (Bleul CC *et al.*, 1996b).

c- Rôle du couple CXCL12/CXCR4 :

- Rôle majeur dans l'hématopoïèse :

Des modèles de souris invalidées pour CXCR4 ou CXCL12 ont démontré que le couple est très largement impliqué dans l'hématopoïèse. L'invalidation du gène de CXCL12 a mis en évidence que cette chimiokine est un facteur essentiel dans le déroulement de la lymphopoïèse B et de la myélopoïèse anténatale. En effet, les souris CXCL12^{-/-} présentent de multiples anomalies de l'hématopoïèse caractérisées par une diminution sévère de la lymphopoïèse B intra-hépatique et médullaire, une diminution et une absence de myélopoïèse respectivement dans le foie et la moelle osseuse (Ma Q *et al.*, 1998), et une absence d'anomalie de l'ontogénèse T. La moitié d'entre elles meurent *in utero* (à E18.5), l'autre moitié meurt quelques heures après la naissance (Nagasawa T *et al.*, 1996). Les souris invalidées pour le gène codant CXCR4 présentent des phénotypes similaires (Takahama Y *et al.*, 2006) : elles meurent *in utero* (décès à E18.5) et présentent notamment un défaut d'hématopoïèse.

Le couple CXCL12/CXCR4 est aussi essentiel dans la domiciliation et la rétention des cellules hématopoïétiques dans le foie fœtal puis dans la MO adulte (Lee Y *et al.*, 2002, Ma Q *et al.*, 1999).

Enfin, l'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle important dans la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (Voermans C *et al.*, 2001). Des expériences menées sur des souris dont l'expression de CXCR4 a été invalidée sélectivement sur le lignage B, montrent que CXCR4 joue un rôle important dans la rétention des précurseurs B dans la MO. En effet, en absence de CXCR4 à leur surface, les précurseurs des LB s'échappent de leur site de production et se localisent dans les follicules de la rate. Les LB diminuent alors en périphérie, notamment dans le péritoine (Nie Y *et al.*, 2004).

Les phénotypes des souris CXCL12^{-/-} et CXCR4^{-/-} impliquent le couple CXCL12/CXCR4 dans la vascularisation spécifique d'organe durant les phases précoces du développement embryonnaire (Tachibana *et al.*, 1998). La fonction de ce couple dans la morphogénèse vasculaire s'étend chez l'adulte (Salvucci O *et al.*, 2002).

- Maintien de l'homéostasie du trafic leucocytaire :

Aucune altération architecturale des ganglions lymphatiques n'a été observée, que ce soit chez les souris CXCL12^{-/-} ou CXCR4^{-/-} (Ma Q *et al.*, 1999), ce qui limite la participation du couple CXCL12/CXCR4 à l'entrée des lymphocytes naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, CXCL12, via son récepteur, contribue à la migration des LT et des LB (Okada T *et al.*, 2002). Il orchestre la domiciliation, la maturation et la différenciation des LB dans la rate et les ganglions (Allen CD *et al.*, 2004, Bleul CC *et al.*, 1999, Caron G *et al.*, 2009, Chan TD *et al.*, 2009, Henderson RB *et al.*, 2010, Nie Y *et al.*, 2004) et oriente les cellules productrices d'anticorps (Ac) (les LB mémoires et les plasmocytes) vers des « niches » spécifiques des tissus lymphoïdes comme la pulpe rouge de la rate ou la MO (Hargreaves DC *et al.*, 2001, Kabashima K *et al.*, 2006, Nakayama T *et al.*, 2003) et les LT naïfs vers les ganglions lymphoïdes et les plaques de Peyer (Bai Z *et al.*, 2009).

- Implication dans certains processus pathologiques périphériques :

CXCL12/CXCR4 participe à des processus pathologiques périphériques : il régule, par exemple, l'accumulation de LT dans les tissus rhumatoïdes sinoviaux dans la polyarthrite rhumatoïde (Buckley CD *et al.*, 2000). Il participe à la formation d'infiltrats inflammatoires de neutrophiles ou de lymphocytes lors de l'inflammation rénale dans le cas du lupus (Wang A *et al.*, 2009), dans le foie lors de l'hépatite C (Wald O *et al.*, 2004), ou dans les poumons dans le cas de syndromes de détresse respiratoire aiguë (Petty JM *et al.*, 2007) mais aussi lors d'infections fulminantes comme la septicémie (Ding Z *et al.*, 2006). Le couple CXCL12/CXCR4 est aussi impliqué dans les processus inflammatoires qui se mettent en place dans l'asthme : la neutralisation de CXCR4 diminue significativement l'hyperéosinophilie pulmonaire dans un modèle murin d'allergie des voies respiratoires (Gonzalo JA *et al.*, 2000).

CXCR4 est très largement étudié en cancérogenèse. En effet, il est détecté dans un grand nombre de cancers d'origines diverses et il est le RCK le plus exprimé par les cellules cancéreuses (Balkwill F *et al.*, 2004). Son expression est plus importante dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux adjacents (Müller A *et al.*, 2001, Sun YX *et al.*, 2003). Cette surexpression est la conséquence de l'activation de différents facteurs. Par exemple, l'activation du facteur HIF-1 α (Hypoxia Inducible factor I) augmente l'expression de CXCR4 pendant la progression tumorale (Hirota K *et al.*, 2006) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) lors de l'invasion cellulaire dans le cancer du sein (Bachelder RE *et al.*, 2002). Certaines oncoprotéines peuvent aussi induire la production de CXCR4, comme PAX3-FKHR (Libura J *et al.*, 2002) ou RET/PTC (Rearrange in Transformation/Papillary Thyroid Carcinoma) (Castellone MD *et al.*, 2004). L'augmentation de CXCR4 peut être due aussi à une modification de la régulation post-traductionnelle qui passe par l'inhibition de l'ubiquitination (l'ubiquitination permettant la dégradation du récepteur) (Li YM *et al.*, 2004).

L'axe CXCL12/CXCR4 serait impliqué dans les phénomènes de métastases de

certaines tumeurs. En effet, l'activation de CXCR4 stimule la production de métalloprotéases qui augmentent la capacité des cellules tumorales à sortir du site primaire de tumeur (Fernandis AZ *et al.*, 2004, Janowska-Wieczorek A *et al.*, 2000, Samara GJ *et al.*, 2004). De plus, CXCL12 est capable d'améliorer l'activité des intégrines (Campbell JJ *et al.*, 1998) et ainsi de faciliter l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium. Il a notamment été montré que les métastases du cancer du sein se forment préférentiellement dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la MO où CXCL12 est fortement exprimée (Allinen M *et al.*, 2004). L'utilisation d'Ac neutralisants anti-CXCR4 ou de siRNA (small interfering RNA) qui vont inhiber le récepteur, limite la formation des métastases et le développement des cellules cancéreuses (Lapteva N *et al.*, 2005, Müller A *et al.*, 2001).

B- Voies de signalisation de CXCR4 :

La fixation de CXCL12 au récepteur CXCR4 conduit à l'activation de signaux dépendants ou non des protéines G hétérotrimériques. Ces signaux peuvent influencer la cellule à migrer en réponse à la chimiokine, ou à produire d'autres facteurs de transcription permettant sa prolifération et/ou sa survie.

a- Voies dépendantes des protéines G :

Les protéines G sont composées de 3 sous-unités α , β et γ . En absence de fixation de la chimiokine au récepteur, elles sont inactives. La fixation de CXCL12 à son récepteur entraîne un changement de conformation de la protéine G. Cette protéine se fixe alors au récepteur, ce qui provoque son clivage. Les sous-unités β et γ associées vont ensuite activer la phospholipase C (PLC) (Busillo JM, Benovic JL, 2007), premier maillon des voies d'activation dépendantes du calcium, et la voie d'activation de la PI3-kinase (Phosphoinositide-3 kinase) qui passe par les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Erk1 et Erk2 (Ganju RK *et al.*, 1998, Sotsios Y *et al.*, 1999). De son côté, la sous-unité α active les tyrosines kinases de la famille Src (Busillo JM, Benovic JL, 2007).

b- Voies indépendantes des protéines G :

La fixation de CXCL12 sur son récepteur permet la phosphorylation de JAK2 et JAK3, ce qui induit leur association avec CXCR4 et leur activation (Vila-Coro AJ *et al.*, 1999). L'activation de la voie STAT qui en résulte passe notamment par l'activation des facteurs de transcription de la voie STAT : JAK1, la tyrosine kinase2 (TYK2), STAT2 et STAT4 comme le montrent Zhang XF *et al.* sur une lignée cellulaire de progéniteurs humains (Zhang XF *et al.*, 2001). Les auteurs montrent aussi l'association de JAK2 avec la PI3K et

ainsi que JAK2 est un facteur indispensable à la migration des leucocytes en réponse à CXCL12. Ahr B *et al.* ont montré plus précisément que c'est la boucle intracellulaire BICIII du récepteur qui est nécessaire à l'activation de JAK2 et conduit à la phosphorylation d'une tyrosine cytoplasmique présente dans la seconde boucle intracellulaire (BICII), ce qui permet l'ancrage de STAT3 puis sa phosphorylation. (figure2) (Ahr B *et al.*, 2005).

Une seconde voie indépendante des protéines G passe par les β -arrestines (β -arr), longtemps considérées uniquement comme régulateurs négatifs de CXCR4. Les β -arr (β -arr2 et β -arr3) sont impliquées dans l'internalisation du récepteur mais peuvent aussi induire leur propre cascade de signalisation (Fong AM *et al.*, 2002) : ainsi, la β -arr2 et la β -arr3 améliorent l'activation de CXCR4 qui passe par ERK (Cheng ZJ *et al.*, 2000) et la β -arr3 est plus particulièrement impliquée dans l'activation de la kinase p38 MAPK et dans la stimulation de la migration en réponse à CXCL12 (Sun Y *et al.*, 2002).

C- Régulation de l'expression de CXCR4 :

a- Régulation transcriptionnelle de CXCR4 :

Bien que la région promotrice du gène *CXCR4* contienne un grand nombre de séquences consensus de régulation, le contrôle de la transcription se fait surtout par l'action opposée de 2 principaux régulateurs : NRF-1 (Nuclear respiratory factor-1) en association avec SP-1 (Specificity protein 1) régule positivement la transcription (Wegner SA *et al.*, 1998) alors que la régulation négative se fait par le biais de YY1 (Ying Yang 1) (Moriuchi M *et al.*, 1999).

L'expression de CXCR4 peut être augmentée par les seconds messagers intracellulaires comme le calcium (Moriuchi M *et al.*, 1997), l'AMPc (Cristillo AD *et al.*, 2002) ou par certaines cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 TGF- β , β FGF, VEGF et EGF). Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'INF- γ et l'IL-1 β diminuent quand à elles l'expression de ce récepteur (Busillo JM, Benovic JL, 2007).

L'expression de CXCR4 est aussi induite par HIF-1 $_$ (Hypoxia-inducible factor), qui est un médiateur de l'hypoxie et dont l'expression est fréquemment dérégulée dans les cancers (Hirota K *et al.*, 2006).

b- Régulation de l'expression de la protéine CXCR4 :

De nombreuses modifications post-traductionnelles contribuent à l'expression et à la fonction de CXCR4. Parmi celles-ci, on peut noter la glycosylation. En effet, il existe 2 sites potentiels de glycosylation dans la partie extracellulaire (site asparagine) : Asn11 et Asn176 (Berson JF *et al.*, 1996). La mutation de Asn11 en glutamine ou en leucine modifie la fixation de CXCL12 sur CXCR4 et diminue les signaux de transduction habituellement induits (Wang

J *et al.*, 2004).

D'autre part, CXCR4 subit la sulfatation de trois tyrosines présentes dans sa partie extracellulaire: Tyr7, Tyr12 et Tyr21 (Tyr21 étant la plus touchée par ce processus). Les travaux de Farzan *et al* ont montré que la sulfatation des tyrosines n'entraîne pas de modification fonctionnelle du récepteur (l'activité de co-récepteur de VIH n'est pas régulée) mais induit une modification de la fixation du ligand à son récepteur (Farzan M *et al.*, 2002), la Tyr21 se fixant à un site spécifique de CXCL12 (Veldkamp CT *et al.*, 2006).

c- Oligomérisation :

La fixation de CXCL12 à son récepteur provoque une dimérisation de celui-ci et participe à la stabilité des dimères ainsi formés (Vila-Coro AJ *et al.*, 1999). L'homooligomérisation et l'hétéro-oligomérisation du récepteur CXCR4 peuvent être des moyens efficaces de régulation. Il a été montré que lorsque CXCR4 forme des hétérodimères avec un autre récepteur de chimiokine, CCR2, sa fonction de co-récepteur du VIH est affectée (Basmaciogullari S *et al.*, 2006Rodriguez-Frade JM *et al.*, 2004). Agrawal *et al.* ont montré qu'une mutation de CCR5, entraînant une réduction de son expression à la surface des cellules, s'accompagne d'une diminution de l'expression de CXCR4 (Agrawal *et al.*, 2004). Par la suite, il a été montré que CXCR4 et CCR5 sont recrutés ensemble au niveau de la synapse immunologique au cours de la stimulation des LT par les cellules présentatrices d'antigène et que la coopération entre ces 2 récepteurs est nécessaire à la costimulation des LT induite par les chimiokines (Cotento RL *et al.*, 2008).

Les conséquences fonctionnelles de la dimérisation de CXCR4 ne sont pas connues *in vivo*. Cependant, il a été montré par Vila-Coro *et al* que la dimérisation de CXCR4 est nécessaire à l'activation des voies indépendantes des protéines G (Vila-Coro *et al.*, 1999).

D- Régulation de l'activation de CXCR4 :

a- Régulation de la fixation de CXCL12 :

- Régulation négative :

Lors d'une réponse inflammatoire, il se produit une libération exacerbée de protéases comme la cathepsin G et l'élastase par les neutrophiles. Celles-ci inactivent la chimiokine CXCL12 par clivage de résidus de la partie N-ter indispensables à sa fixation sur CXCR4 (Delgado MB *et al.*, 2001, Velenzuela-Fernandez A *et al.*, 2002). D'autre part, il a été montré que la protéase CD26 exprimée à la surface des cellules est aussi capable de cliver et d'inhiber CXCL12 (Christopherson KW 2nd *et al.*, 2002).

- Régulation positive :

CXCL12 a la capacité d'interagir avec les glycosaminoglycanes comme les héparines sulfates (Hoogewerf AJ *et al.*, 1997). Cette association induit l'oligomérisation de CXCL12, ce qui immobilise la chimiokine. Ce phénomène est aussi observé lors de concentrations élevées de CXCL12 (Sadir R *et al.*, 2001). Il a été montré que lorsque CXCL12 est associée aux glycosaminoglycanes, la migration cellulaire est plus importante (Netelenbos T *et al.*, 2002).

Il est possible de permettre à CXCR4 de devenir sensible à de faibles concentrations de CXCL12. En effet, il a été suggéré que les produits libérés pendant la réponse inflammatoire (Majka M *et al.*, 2000) ou bien l'activation des plaquettes (Janowska-Wieczorek A *et al.*, 2001) pourraient initier la migration des cellules souches hématopoïétiques en réponse à de faibles concentrations de CXCL12 (Wysoczynski M *et al.*, 2005). Ceci pourrait être dû au changement de localisation de CXCR4 dans la membrane cellulaire, et plus particulièrement à son incorporation au sein de radeaux riches en lipides (Triantafilou M *et al.*, 2002). L'incorporation du récepteur est induite par la fixation de son ligand et lui permet de devenir fonctionnel (Le Y *et al.*, 2005). Elle s'accompagne de l'activation de différents acteurs des voies d'activation de CXCR4 : tyrosine kinase, PI3 kinase, protéines G (Wysoczynski M *et al.*, 2005).

b- Régulation des voies dépendantes et indépendante des protéines G :

Les protéines G sont sensibles aux effets inhibiteurs de la toxine *Bordetella Pertussis* : un traitement par cette toxine provoque une perturbation du couplage du ligand au récepteur. La majorité des voies de signalisation de CXCR4 sont donc sensibles à cette toxine. De plus, il est possible d'agir négativement sur les différentes voies de signalisation en utilisant des inhibiteurs spécifiques de l'une des molécules engagées dans ces voies (ex LY294002 ou bien Wortmannin, inhibiteurs de la PI3K) (Sotsios Y *et al.*, 1999).

La régulation des voies indépendantes des protéines G se fait quand à elle essentiellement par les β -arrestines (Fong AM *et al.*, 2002).

E- Régulation des signaux :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont régulés par 3 processus successifs : la désensibilisation, l'internalisation, la dégradation et/ou le recyclage.

a- La désensibilisation :

Suite à son activation par CXCL12, CXCR4 est rapidement phosphorylé et internalisé (Haribabu B *et al.*, 1997). La phosphorylation des résidus serine/thréonine de la 3^{ème} boucle

intracellulaire (BICIII) de CXCR4 présente dans la région C-ter intracytoplasmique se produit sous l'action des kinases du récepteur, appelées GRK, ce qui entraîne sa désensibilisation. Cette phosphorylation de la partie intracytoplasmique permet en effet la fixation des β -arr (β -arr2 et/ou de la β -arr3), ce qui provoque la séparation de la protéine G du récepteur et conduit à l'internalisation de ce dernier (Krupick JG *et al.*, 1998). Plusieurs GRK peuvent être impliquées dans la phosphorylation de CXCR4 : GRK-6 (mise en évidence grâce à un modèle de souris déficientes pour le gène de cette kinase) (Fong AM *et al.*, 2002), GRK-2 (Orsini MJ *et al.*, 1999) et GRK-3 (Balabanian K *et al.*, 2008).

La désensibilisation des RCPG peut aussi être hétérologue. Ce processus passe par l'activation de seconds messagers dépendants des protéines kinases comme PKA et PKC. Dans la séquence protéique de CXCR4, il existe plusieurs sites potentiels de phosphorylation pour la PKC. Il a été montré que l'activation directe de la PKC par des esters de phorbol conduit à la phosphorylation et à l'internalisation de CXCR4 (Haribabu B *et al.*, 1997). L'engagement des récepteurs de l'antigène des LT ou LB, l'activation de CXCR1, de CXCR2 ou CCR5 qui sont des activateurs de la PKC sont aussi impliqués dans l'induction de l'internalisation de CXCR4 (Guinamard R *et al.*, 1999, Hecht I *et al.*, 2003, Peacock JW *et al.*, 1999, Richardson RM *et al.*, 2003, Suratt BT *et al.*, 2004).

b- L'internalisation :

La phosphorylation de la partie intracytoplasmique de CXCR4 conduit à la fixation de la β -arr2 et/ou la β -arr3 qui interagissent avec la clathrine (Goodman OB Jr *et al.*, 1996), et d'autres molécules comme AP2 (Activating protein 2) (Laporte SA *et al.*, 1999) et les phosphoinositides (Gaidarov I *et al.*, 1999). Ceci conduit à la formation du puits d'endocytose puis à la formation d'un endosome contenant le récepteur.

Les résidus tyrosine de la partie C-ter peuvent être aussi phosphorylés lors de l'activation par les cytokines. L'internalisation de CXCR4 est alors indépendante de son ligand (Wang J *et al.*, 2001).

c- La dégradation :

Les RCPG peuvent être recyclés à la membrane (Signoret N *et al.*, 1998) ou dégradés dans les lysosomes (Marchese A *et al.*, 2003). Le recyclage à la membrane peut s'effectuer suite à l'internalisation induite par la PKC (Signoret N *et al.*, 1997). CXCR4 subit l'ubiquitination effectuée par l'E3 ubiquitin ligase (AIP4) sur 3 résidus lysine de l'extrémité C-ter (Marchese A *et al.*, 2001). Il est ensuite pris en charge dans le lysosome pour y être dégradé (Marchese A *et al.*, 2003).

L'ubiquitination et la dégradation du récepteur sont inhibées lorsque les 3 résidus lysine sont mutés en résidus arginine. D'autres mutations n'affectent qu'une étape de la

dégradation du récepteur : par exemple, celle de la sérine 330 en alanine conduit à une inhibition partielle de la dégradation du récepteur mais n'affecte pas l'internalisation (Marchese A *et al.*, 2001).

F- Dérégulation de CXCR4 : cas du syndrome WHIM

a- Définition clinique du Syndrome WHIM:

Le Syndrome WHIM (SW) (**W** pour « *warts* » qui signifie « verrues » en français, **H** pour *hypogammaglobulinemia*, **I** pour *infections/immunodeficiency*, et **M** pour *myelokathexis*) a été décrit pour la 1ère fois en 1990 (Wetzler M *et al.*, 1990). Ce syndrome est un déficit immunitaire à transmission autosomique dominante qui touche une très faible proportion d'individus dans le monde. Seuls une cinquantaine de cas sont décrits dans la littérature à ce jour (Kawai T *et al.*, 2009). Le Syndrome WHIM est caractérisé par une susceptibilité importante aux infections au virus du Papillome humain, ce qui se manifeste par la présence d'un grand nombre de verrues cutanées et de condylomes ano-génitaux dysplasiques (**W**, « *Warts* »). Certains patients présentent une hypogammaglobulinémie (**H**) qui affecte principalement les IgG (Mc Guire PJ *et al.*, 2010). Cependant, suite à une immunisation par un antigène T-dépendant, les patients produisent une réponse humorale spécifique, bien que les titres sériques déclinent rapidement (Gulino AV *et al.*, 2004). Tous les patients souffrent d'infections récurrentes (**I**) (pneumonies, sinusites, infections urinaires, etc...) et sont particulièrement sensibles aux infections dues aux bactéries à capsule. On observe aussi dans la MO une rétention anormale de neutrophiles hypermatures au profil apoptotique caractéristique: cytoplasme contenant de très nombreuses vacuoles, hypersegmentation du noyau et hypercondensation de la chromatine, d'où le terme de « myélokathexie » (**M**) (Gorlin RJ *et al.*, 2000). Ce critère constitue le signe pathognomonique du SW.

Le SW est invariablement associé à une leucopénie circulante profonde qui affecte les neutrophiles, les LT, les LB et parfois les monocytes et les cellules dendritiques (Kawai T *et al.*, 2009, Siedlar M *et al.*, 2008, Tassone L *et al.*, 2010). Les analyses immunophénotypiques ont révélé une diminution du nombre de LB mémoires et de LT naïfs et centraux/mémoires, en contraste avec une accumulation de LT effecteurs/mémoires présentant un répertoire T restreint (Gulino AV *et al.*, 2004).

Contrairement à d'autres maladies héréditaires caractérisées par une neutropénie, les patients atteints du SW ne développent pas d'infections qui engagent le pronostic vital. En effet, une infection aiguë, une stimulation par le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), l'adrénaline ou les glucocorticoïdes induisent une mobilisation rapide des neutrophiles de la MO vers le sang, ce qui corrige transitoirement la neutropénie circulante (Kawai T *et al.*, 2009, Notarangelo LD *et al.*, 2009). Ceci suggère que la neutropénie résulte

d'une altération de la libération des neutrophiles de la MO plutôt que d'une anomalie de leur production.

L'ensemble des données cliniques et immunologiques indique que le SW est caractérisé par un désordre de la migration leucocytaire, ce qui suggère une anomalie du système des chimiokines/récepteurs de chimiokines.

b- Implication de CXCR4 dans le Syndrome WHIM : défaut d'inactivation de CXCR4

L'année 2003 marque un tournant décisif avec l'identification de mutations hétérozygotes localisées dans la région codante de *CXCR4* chez certains patients souffrant du SW (Hernandez PA *et al.*, 2003). La majorité des patients présentent une mutation hétérozygote localisée dans *CXCR4* qui tronquent partiellement le domaine intracellulaire C-ter de *CXCR4* [WHIM^{muté(m)}; génotype : *CXCR4*⁺/*CXCR4*^{muté}]. A l'heure actuelle, 6 sites différents de mutations ont été mis en évidence (Hernandez PA *et al.*, 2003, Kawai T *et al.*, 2009, Takaya J *et al.*, 2009, Tassone L *et al.*, 2009).

L'intégrité du domaine C-ter étant requise pour l'inactivation de *CXCR4*, il était logique de suspecter que les mutations tronquantes altèrent ce processus et conduisent à un gain de fonction de *CXCR4*. L'utilisation de LT et de neutrophiles circulants résiduels de patients [WHIM^m] et la production de lignées cellulaires surexprimant un *CXCR4* muté ont permis de révéler qu'effectivement ces différentes mutations mènent à l'expression de récepteurs tronqués qui présentent une activation accrue et soutenue de protéines G (Busillo JM, Benovic JL, 2007, Notarangelo LD *et al.*, 2009). Ce phénomène s'explique par l'incapacité du *CXCR4* muté à être découplé des protéines G (ou désensibilisé) et à être internalisé après la liaison à CXCL12 (Balabanian K *et al.*, 2005). Des expériences de co-expression des 2 formes, mutée et sauvage, ont mis en évidence que la présence de la forme mutée permet de réguler négativement l'internalisation et l'endocytose du récepteur sauvage. Cette anomalie du processus d'inactivation se traduit par un gain de fonction de *CXCR4*. En effet, les leucocytes présentent une hypersensibilité à l'action chimiotactique de CXCL12 alors que l'expression membranaire du RCK est normale.

Quelques formes familiales sans anomalie de *CXCR4* ont été également identifiées [WHIM^{sauvage(s)}; génotype : *CXCR4*⁺/*CXCR4*⁺], indiquant une hétérogénéité génétique du SW (Balabanian K *et al.*, 2005). Les leucocytes des patients [WHIM^s] présentent des dysfonctions spécifiques de l'axe CXCL12/*CXCR4* semblables à celles observées chez les patients [WHIM^m].

En dépit de leurs différences génétiques, les deux formes du SW présentent, comme élément pathogénique commun, un gain de fonction de *CXCR4* qui est probablement à l'origine des manifestations immuno-hématologiques et infectieuses. Cependant, chez les patients

[WHIM^m], les bases moléculaires de l'hyperactivité du récepteur tronqué et son rôle étiologique dans les manifestations cliniques restent à définir. Chez les patients [WHIM^s], l'activité d'autres récepteurs de chimiokine, incluant celle de CXCR7, est préservée, suggérant l'existence d'une anomalie affectant un effecteur intracellulaire sélectivement impliqué dans la régulation de l'inactivation de CXCR4. L'étude des partenaires intracellulaires de CXCR4 a récemment permis d'apporter des éléments de réponse sur les mécanismes mis en jeu.

c- Altération du système GRK/_-arr dans le SW :

Dans la forme [WHIM^m], CXCR4 muté est réfractaire à la désensibilisation et à l'endocytose, ce qui souligne que l'intégrité du domaine C-ter est requise pour l'inactivation du RCK *via* sa phosphorylation par certaines GRKs et la liaison des _-arr. Dans ce sens, la surexpression de _-arr ne permet pas de restaurer l'atténuation du CXCR4 muté (Lagane B *et al.*, 2008). Cependant, CXCR4 muté est capable d'interagir avec les _-arr *via* un domaine distinct de son extrémité C-ter : le motif Ser/His/Ser/Lys (SHSK) contenu dans la 3^{ème} boucle intracellulaire (BICIII). Cette liaison est associée à l'induction de voies de signalisation G-indépendantes (ex : ERK1/2) qui régulent positivement la chimiotaxie (Premont RT *et al.*, 2007). Cet apparent paradoxe témoigne de l'ambivalence des _-arr dont les fonctions suppressives de la signalisation G-dépendante ou promotrices de la signalisation G-indépendante dépendent probablement du type de GRK recrutée et du site de fixation sur CXCR4. Ainsi, l'hypersensibilité à CXCL12 pourrait résulter d'une anomalie d'inactivation de CXCR4 (conséquence à un défaut de recrutement des _-arr au domaine C-ter) et d'une signalisation G-indépendante exacerbée (liée à un recrutement favorisé des _-arr à la 3^{ème} BIC). L'identification d'hétérodimères CXCR4¹⁰¹³/CXCR4⁺ suggère un mécanisme par lequel CXCR4 muté exerce un effet dominant négatif sur CXCR4⁺ (Lagane B *et al.*, 2008).

Dans la forme [WHIM^s], une étude approfondie des cellules de patients a dévoilé un rôle clef de la protéine kinase GRK-3 dans la régulation de la désensibilisation et l'internalisation de CXCR4 (Balabanian K *et al.*, 2008). En effet, l'extinction de *GRK-3* dans des cellules de témoins par l'utilisation d'ARNs interférents reproduit des anomalies de CXCR4 similaires à celles documentées chez les patients : défaut d'inactivation de CXCR4 et chimiotaxie exacerbée en réponse à CXCL12. Inversement, la surexpression de *GRK-3* dans les cellules de patients corrige le défaut de désensibilisation et d'internalisation de CXCR4 et normalise la chimiotaxie induite par CXCL12. Un déficit sélectif de la protéine GRK-3, résultant d'un défaut de synthèse des ARNm, a été identifié chez un des patients. Ces données révèlent une spécialisation de la GRK-3 dans l'atténuation de CXCR4 et identifient de plus, chez les patients [WHIM^s], une dérégulation de cette kinase comme une nouvelle anomalie liée au SW.

d- L'approche thérapeutique :

Avant la découverte du rôle prédominant de CXCR4 dans le SW, les traitements proposés aux patients souffrant de cette pathologie sont identiques à ceux administrés aux patients présentant une neutropénie sévère accompagnée d'une forte hypogammaglobulémie. Ils consistent en l'injection de G-CSF et GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) qui provoquent l'augmentation et le maintien du pool de neutrophiles circulants qui sécrètent l'élastase, protéase responsable du clivage de CXCL12 et de CXCR4 (Bohinjec J *et al.*, 1992, Hess U *et al.*, 1992, Weston B *et al.*, 1991, Wetzler M *et al.*, 1992). L'augmentation de la sécrétion de l'élastase entraîne une diminution de l'activité de l'axe CXCL12/CXCR4 et augmente ainsi le relargage de neutrophiles matures, de la MO vers le sang périphérique. Ce traitement présente de nombreux inconvénients: contrainte d'une administration sous-cutanée journalière, nécessité d'ajuster la dose à chaque patient, répercussion du traitement sur la croissance chez les enfants.

Afin de limiter les risques d'infections liés à l'hypogammaglobulinémie, l'injection d'immunoglobulines en intraveineuse (IVIg) peut être effectuée mais là aussi se pose la problématique du dosage (Goddard EA *et al.*, 1994, Wetzler M *et al.*, 1990).

Une autre piste de traitement est envisagée depuis la mise en évidence de l'implication de CXCR4 : l'utilisation d'un antagoniste de ce RCK, l'AMD3100. En effet, en 1998, Donzella *et al* montrent que l'entrée du VIH est inhibée par la fixation spécifique de cette petite molécule sur CXCR4 (Donzella GA *et al.*, 1998). En 2002, Hatse *et al.* démontrent que l'AM3100 est un antagoniste spécifique de CXCR4 : en inhibant la chimiotaxie et l'endocytose induite par CXCL12, il pourrait être utilisé entre autre pour le traitement des processus pathologiques impliquant l'axe CXCR4/CXCL12 (Hatse S *et al.*, 2002). L'administration de l'AMD3100 à des volontaires sains ou à des patients atteints de myélomes multiples provoque très rapidement une augmentation du nombre de cellules progénitrices mais aussi du nombre de neutrophiles et de lymphocytes circulants (Broxmeyer HE *et al.*, 2005, Devine SM *et al.*, 2004, Flomemberg N *et al.*, 2005, Liles WC *et al.*, 2005). Plus récemment, MacDermott *et al.* ont montré que l'AMD3100 peut bloquer le signal induit par le CXCR4 muté en position R334X, ce qui positionne cet antagoniste comme un bon candidat pour le traitement des patients atteints du SW (McDermott DH *et al.*, 2010). Chez la souris, l'utilisation d'un antagoniste de CXCR4, CTCE-0021, induit aussi la mobilisation des cellules polynucléées et progénitrices en provoquant la dérégulation de CXCR4 (Pelus LM *et al.*, 2005).

BIBLIOGRAPHIE

1.

- Agrawal L, Lu X, Qingwen J, VanHorn-Ali Z, Nicolescu IV, McDermott DH, Murphy PM, Alkhatib G. (2004) Role for CCR5Delta32 protein in resistance to R5, R5X4, and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells. *J Virol.* 78(5):2277-87.
2. Ahr B, Denizot M, Robert-Hebmann V, Brelot A, Biard-Piechaczyk M. (2005) Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *J Biol Chem.* 280(8):6692-700.
 3. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG. (2004) Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol.* 5(9):943-52.
 4. Allende ML, Tuymetova G, Lee BG, Bonifacino E, Wu YP, Proia RL. (2010) S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J Exp Med.* 207(5):1113-24.
 5. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 6(1):17-32.
 6. Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Fujii N, Amagai T, Nagasawa T. (2003) A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol.* 170(9):4649-55.
 7. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. (2002) Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* 62(24):7203-6.
 8. Bai Z, Hayasaka H, Kobayashi M, Li W, Guo Z, Jang MH, Kondo A, Choi BI, Iwakura Y, Miyasaka M. (2009) CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naive T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J Immunol.* 182(3):1287-95.
 9. Balabanian K, Couderc J, Bouchet-Delbos L, Amara A, Berrebi D, Foussat A, Baleux F, Portier A, Durand-Gasselini I, Coffman RL, Galanaud P, Peuchmaur M, Emilie D. (2003) Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J Immunol.* 170(6):3392-400.
 10. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelerie F. (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 280(42):35760-6.
 11. Balabanian K, Levoye A, Klemm L, Lagane B, Hermine O, Harriague J, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Bachelerie F. (2008) Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest.* 118(3):1074-84.
 12. Balkwill F. (2004) The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 14(3):171-9.
 13. Basmaciogullari S, Pacheco B, Bour S, Sodroski J. (2006) Specific interaction of CXCR4 with CD4 and CD8alpha: functional analysis of the CD4/CXCR4 interaction in the context of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Virology.* 353(1):52-67.
 14. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. (2000) B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* 192:271-280
 15. Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. (1996) A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol.* 70(9):6288-95.
 16. Biajoux V, Bignon A, Bouchet-Delbos L, Emilie D, Balabanian K. (2010) Dysfonction de l'axe de signalisation CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 dans le Syndrome WHIM et la Lymphopénie T CD4+ Idiopathique. *Biol Aujourd'hui.* 204(4):273-84.
 17. Bignon A, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Emilie D, Lortholary O, Balabanian K. (2011) CXCR4, une cible thérapeutique dans certains déficits immunitaires rares ? *Med Sci.* 27(4):391-397.
 18. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 382(6594):829-33.
 19. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) *J Exp Med.* 184(3):1101-9.

20. Bleul CC, Schultze JL, Springer TA. (1998) B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med.* 187(5):753-62.
21. Bohinjec J, Andoljsek D. Neutrophil-releasing activity of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in myelokathexis. *Br J Haematol.* 1992;82(1):169-70.
22. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. (2008) Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol.* 9(9):970-80.
23. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srouf EF. (2005) Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 201(8):1307-18.
24. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Curnow SJ, Lord JM, Scheel-Toellner D, Salmon M. (2000) Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol.* 165(6):3423-9.
25. Busillo JM, Benovic JL. (2007) Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1768(4):952-63.
26. Calderón L, Boehm T. (2011) Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(18):7517-22.
27. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science.* 279(5349):381-4.
28. Caron G, Le Gallou S, Lamy T, Tarte K, Fest T. (2009) CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J Immunol.* 182(12):7595-602.
29. Casamayor-Pallejà M, Mondière P, Amara A, Bella C, Dieu-Nosjean MC, Caux C, Defrance T. (2001) Expression of macrophage inflammatory protein-3alpha, stromal cell-derived factor-1, and B-cell-attracting chemokine-1 identifies the tonsil crypt as an attractive site for B cells. *Blood.* 97(12):3992-4.
30. Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Carlomagno F, Basolo F, Faviana P, Kruhoffer M, Orntoft T, Russell JP, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Melillo RM. (2004) Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene.* 23(35):5958-67.
31. Chan TD, Gatto D, Wood K, Camidge T, Basten A, Brink R. (2009) Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J Immunol.* 183(5):3139-49.
32. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, Wu GX, Pei G. (2000) beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem.* 275(4):2479-85.
33. Chow KY, Brotin É, Ben Khalifa Y, Carthagena L, Teissier S, Danckaert A, Galzi JL, Arenzana-Seisdedos F, Thierry F, Bachelier F. (2010) A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell Host Microbe.* 8(6):523-33.
34. Christopherson KW 2nd, Hangoc G, Broxmeyer HE. (2002) Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol.* 169(12):7000-8.
35. Contento RL, Molon B, Boullaran C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A. (2008) CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(29):10101-6.
36. Coulomb-L'Hermin A, Amara A, Schiff C, Durand-Gasselini I, Foussat A, Delaunay T, Chaouat G, Capron F, Ledee N, Galanaud P, Arenzana-Seisdedos F, Emilie D. (1999) Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(15):8585-90.
37. Cristillo AD, Highbarger HC, Dewar RL, Dimitrov DS, Golding H, Bierer BE. (2002)

Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element. *FASEB J.* 16(3):354-64.

38. De La Luz Sierra M, Gasperini P, McCormick PJ, Zhu J, Tosato G. (2007) Transcription factor Gfi-1 induced by G-CSF is a negative regulator of CXCR4 in myeloid cells. *Blood.* 110(7):2276-85.
39. Delgado MB, Clark-Lewis I, Loetscher P, Langen H, Thelen M, Baggiolini M, Wolf M. (2001) Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol.* 31(3):699-707.
40. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, Liesveld J, Weisdorf D, Badel K, Calandra G, DiPersio JF. (2004) Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 22(6):1095-102.
41. Devine SM, Vij R, Rettig M, Todt L, McGlauchlen K, Fisher N, Devine H, Link DC, Calandra G, Bridger G, Westervelt P, Dipersio JF. (2008) Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood.* 112(4):990-8.
42. Diaz GA. (2005) CXCR4 mutations in WHIM syndrome: a misguided immune system? *Immunol Rev.* 203:235-43. *Revue*
43. Ding Z, Jia SH, Marshall JC, Downey GP, Waddell TK. (2006) Up-regulation of functional CXCR4 expression on human lymphocytes in sepsis. *Crit Care Med.* 34(12):3011-7.
44. Donahue RE, Jin P, Bonifacino AC, Metzger ME, Ren J, Wang E, Stroncek DF. (2009) Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures. *Blood.* 114(12):2530-41.
45. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. (1998) AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med.* 4(1):72-7.
46. Dresch C, Flandrin G, Breton-Gorius J. (1980) Phagocytosis of neutrophil polymorphonuclears by macrophages in human bone marrow: importance in granulopoiesis. *J. Clin. Pathol.* 33, 1110-1113.
47. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. (2010) CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 120(7):2423-31.
48. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. (2009) CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood.* 113, 4711-4719.
49. Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, Amada K, Okamoto R, Fujii N, Kishimoto T, Katsura Y, Nagasawa T. (2001) The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity.* 15(2):323-34.
50. Farzan M, Babcock GJ, Vasilieva N, Wright PL, Kiprilov E, Mirzabekov T, Choe H. (2002) The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry. *J Biol Chem.* 277(33):29484-9.
51. Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM, Delaney A, Schappert K, Clark-Lewis I, Jirik FR. (1993) Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics.* 16(3):707-12.
52. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 10;272(5263):872-7.
53. Fermandis AZ, Prasad A, Band H, Klösel R, Ganju RK. (2004) Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene.* 23(1):157-67.
54. Flomenberg N, Devine SM, Dipersio JF, Liesveld JL, McCarty JM, Rowley SD, Vesole DH, Badel K, Calandra G. (2005) The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood.* 106(5):1867-74.
55. Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD (2002).

- Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(11):7478-83.
56. Foussat A, Balabanian K, Amara A, Bouchet-Delbos L, Durand-Gasselini I, Baleux F, Couderc J, Galanaud P, Emilie D. (2001) Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 31(2):350-9.
57. Furze RC, Rankin SM. (2008) The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J.* 22, 3111–3119.
58. Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH. (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* 18(4):871-81.
59. Galzi JL, Hachet-Haas M, Bonnet D, Daubeuf F, Lecat S, Hibert M, Haiech J, Frossard N. (2010) Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther.* 126(1):39-55. *Revue.*
60. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. (2000) Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol.* 165(1):499-508.
61. Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 383(6599):447-50.
62. Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, Lofsness KG, Pittelkow MR, Fenyk JR Jr. (2000) WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet.* 91(5):368-76.
63. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, Marsh M, Kurosaki T, Ravetch JV. (1999) B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med.* 189(9):1461-6.
64. Gulino AV, Moratto D, Sozzani S, Cavadini P, Otero K, Tassone L, Imberti L, Pirovano S, Notarangelo LD, Soresina R, Mazzolari E, Nelson DL, Notarangelo LD, Badolato R. (2004) Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood.* 104(2):444-52.
65. Hachet-Haas M, Balabanian K, Rohmer F, Pons F, Franchet C, Lecat S, Chow KY, Dagher R, Gizzi P, Didier B, Lagane B, Kellenberger E, Bonnet D, Baleux F, Haiech J, Parmentier M, Frossard N, Arenzana-Seisdedos F, Hibert M, Galzi JL. (2008) Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. *J Biol Chem.* 283(34):23189-99.
66. Hamm HE. (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 9;273(2):669-72. *Revue*
67. Hanna J, Bechtel P, Zhai Y, Youssef F, McLachlan K, Mandelboim O. (2004) Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol.* 173(11):6547-63.
68. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. (2001) A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med.* 194(1):45-56.
69. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, Snyderman R. (1997) Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem.* 272(45):28726-31.
70. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. (2001) A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med.* 194(1):45-56.
71. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, Snyderman R. (1997) Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem.* 272(45):28726-31.
72. Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. (2002) Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.* 527(1-3):255-62.
73. Hecht I, Cahalon L, Hershkoviz R, Lahat A, Franitza S, Lider O. (2003) Heterologous desensitization of T cell functions by CCR5 and CXCR4 ligands: inhibition of cellular

- signaling, adhesion and chemotaxis. *Int Immunol.* 15(1):29-38.
74. Heesen M, Berman MA, Höpken UE, Gerard NP, Dorf ME. (1997) Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms. *J Immunol.* 15;158(8):3561-4.
75. Henderson RB, Grys K, Vehlow A, de Bettignies C, Zachacz A, Henley T, Turner M, Batista F, Tybulewicz VL. (2010) A novel Rac-dependent checkpoint in B cell development controls entry into the splenic white pulp and cell survival. *J Exp Med.* 207(4):837-53.
76. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. (2003) Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 34(1):70-4.
77. Hess U, Ganser A, Schnürch HG, Seipelt G, Ottmann OG, Falk S, Schulz G, Hoelzer D. (1992) Myelokathexis treated with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). *Br J Haematol.* 80(2):254-6.
78. Hesselgesser J, Horuk R. (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol.* 5(1):13-26.
79. Hirota K, Semenza GL. (2006) Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 59(1):15-26. *Revue*
80. Holmes R and Zúñiga-Pflücker JC. (2009) The OP9-DL1 System: Generation of T-Lymphocytes from Embryonic or Hematopoietic Stem Cells In Vitro. *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5156
81. Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TN. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry.* 36(44):13570-8.
82. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ. (2001) Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood.* 98(10):3143-9.
83. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak MZ, Cabuhat ML. (2000) Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol.* 28(11):1274-85.
84. Kabashima K, Haynes NM, Xu Y, Nutt SL, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. (2006) Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J Exp Med.* 203(12):2683-90.
85. Kantor AB. (1991) The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today.* 12(11):389-91.
86. Kawai T, Choi U, Cardwell L, DeRavin SS, Naumann N, Whiting-Theobald NL, Linton GF, Moon J, Murphy PM, Malech HL. (2007) WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4. *Blood.* 109(1):78-84.
87. Kawai T, Malech HL. (2009) WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol.* 16(1):20-6. *Revue.*
88. Kim CH, Qu CK, Hangoc G, Cooper S, Anzai N, Feng GS, Broxmeyer HE. (1999) Abnormal chemokine-induced responses of immature and mature hematopoietic cells from motheaten mice implicate the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in chemokine responses. *J Exp Med.* 190(5):681-90.
89. Knaut H, Werz C, Geisler R, Nüsslein-Volhard C; Tübingen 2000 Screen Consortium. (2003) A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature.* 421(6920):279-82.
90. Krupnick JG, Benovic JL. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:289-319.
91. Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, Baleux F, Gunera-Saad N, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F. (2008) CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood.* 112(1):34-44.
92. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(7):3712-7.
93. Lapteva N, Yang AG, Sanders DE, Strube RW, Chen SY. (2005) CXCR4 knockdown

by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther.* 12(1):84-9.

94. Lazarini F, Casanova P, Tham TN, De Clercq E, Arenzana-Seisdedos F, Baleux F, Dubois-Dalcq M. (2000) Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *Eur J Neurosci.* 12(1):117-25.

95. Le Y, Honczarenko M, Glodek AM, Ho DK, Silberstein LE. (2005) CXC chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells. *J Immunol.* 174(5):2582-90.

96. Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Miyazawa K, Ohyashiki K, Broxmeyer HE. (2002) Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood.* 99(12):4307-17.

97. Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, Xia W, Hortobagyi GN, Yu D, Hung MC. (2004) Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell.* 6(5):459-69.

98. Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, Marquez L, Peiper SC, Barr FG, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. (2002) CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood.* 100(7):2597-606.

99. Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, Dehner C, Badel K, Calandra G, Christensen J, Wood B, Price TH, Dale DC. (2005) Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion.* 45(3):295-300.

100. Lukacs NW, Berlin A, Schols D, Skerlj RT, Bridger GJ. (2002) AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am J Pathol.* 160(4):1353-60.

101. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(16):9448-53.

102. Ma Q, Jones D, Springer TA. (1999) The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.* 10(4):463-71.

103. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Kowalska MA, Vilaire G, Pan ZK, Honczarenko M, Marquez LA, Poncz M, Ratajczak MZ. (2000) Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood.* 96(13):4142-51.

104. Marchese A, Benovic JL. (2001) Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem.* 276(49):45509-12.

105. Marchese A, Chen C, Kim YM, Benovic JL. (2003) The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci.* 28(7):369-76.

106. Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL. (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell.* 5(5):709-22.

107. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. (2003) Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 19(4):583-93.

108. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 427(6972):355-60.

109. Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, De Clercq E, Billiau A, Schols D. (2001) AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol.* 167(8):4686-92.

110. Mc Guire PJ, Cunningham-Rundles C, Ochs H, Diaz GA. (2010) Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol.* 135(3):412-21.

111. McDermott DH, Lopez J, Deng F, Liu Q, Ojode T, Chen H, Ulrick J, Kwatema N,

- Kelly C, Anaya-O'Brien S, Garofalo M, Marquesen M, Hilligoss D, Decastro R, Malech HL, Murphy PM. (2010) AMD3100 is a Potent Antagonist at CXCR4(R334X), a Hyperfunctional Mutant Chemokine Receptor and Cause of WHIM Syndrome. *J Cell Mol Med*.
112. Moriuchi M, Moriuchi H, Margolis DM, Fauci AS. (1999) USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol*. 162(10):5986-92.
113. Moriuchi M, Moriuchi H, Turner W, Fauci AS. (1997) Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol*. 159(9):4322-9.
114. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 410(6824):50-6.
115. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 382(6592):635-8.
116. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6):2305-9.
117. Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. (2003) Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol*. 170(3):1136-40.
118. Netelenbos T, Zuijderduijn S, Van Den Born J, Kessler FL, Zweegman S, Huijgens PC, Dräger AM. (2002) Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol*. 72(2):353-62.
119. Nie Y, Han YC, Zou YR. (2008) CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 205(4):777-83.
120. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. (2004) The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med*. 200(9): 1145-56.
121. Notarangelo LD, Badolato R. (2009) Leukocyte trafficking in primary immunodeficiencies. *J Leukoc Biol*. 85(3):335-43. *Revue*.
122. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 29;382(6594):833-5.
123. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Förster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. (2002) Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 196(1):65-75.
124. Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, Kitamura T, Ishikawa S, Matsushima K. (2000) Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine. *Blood*. 96(6):2074-80.
125. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 121(3):335-48.
126. Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Marchese A, Benovic JL. (1999) Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem*. 274(43):31076-86.
127. Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, Delaunay T, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. (1999) Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*. 155(5):1577-86.
128. Peacock JW, Jirik FR. (1999) TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *J Immunol*. 162(1):215-23.
129. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 283(5403):845-8.
130. Pelus LM, Bian H, Fukuda S, Wong D, Merzouk A, Salari H. (2005) The CXCR4 agonist peptide, CTCE-0021, rapidly mobilizes polymorphonuclear neutrophils and

- hematopoietic progenitor cells into peripheral blood and synergizes with granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol.* 33(3):295-307.
131. Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, Jones CC, Cosgrove GP, Cool CD, Rai PR, Brown KK, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. (2007) Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol.* 178(12):8148-57.
132. Pillarisetti K, Gupta SK. (2001) Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation.* 25(5):293-300.
133. Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. (2003) Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol.* 171(9):4521-7.
134. Premont RT, Gainetdinov RR. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69:511-34. *Revue.*
135. Rankin SM. (2010) The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol.* 88(2):241-51. *Revue*
136. Ratajczak MZ, Lee H, Wysoczynski M, Wan W, Marlicz W, Laughlin MJ, Kucia M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. (2010) Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia.* 24(5):976-85.
137. Richardson RM, Tokunaga K, Marjoram R, Sata T, Snyderman R. (2003) Interleukin-8-mediated heterologous receptor internalization provides resistance to HIV-1 infectivity. Role of signal strength and receptor desensitization. *J Biol Chem.* 278(18):15867-73.
138. Rodríguez-Frade JM, del Real G, Serrano A, Hernanz-Falcón P, Soriano SF, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Lucas P, Prieto I, Martínez-A C, Mellado M. (2004) Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. *EMBO J.* 23(1):66-76.
139. Sadir R, Baleux F, Grosdidier A, Imberty A, Lortat-Jacob H. (2001) Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J Biol Chem.* 276(11):8288-96.
140. Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. (2002) Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood.* 99(8):2703-11.
141. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, Vaday GG. (2004) CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 214(2):231-41.
142. Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Koito A. (1998) Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med.* 187(9):1439-49.
143. Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, Von Andrian UH, Weninger W. (2004) CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med.* 199(8):1113-20.
144. Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. (2001) Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood.* 98(4):1226-30.
145. Siedlar M, Rudzki Z, Strach M, Trzyna E, Pituch-Noworolska A, B_ aut-Szlósarczyk A, Bukowska-Strakova K, Lenart M, Grodzicki T, Zembala M. (2008) Familial occurrence of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis (WHIM) syndrome. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 56(6):419-25.
146. Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M. (1997) Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol.* 139(3):651-64.
147. Signoret N, Rosenkilde MM, Klasse PJ, Schwartz TW, Malim MH, Hoxie JA, Marsh M. (1998) Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci.* 111:2819-30.
148. Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG. (1999) The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol.* 163(11):5954-63.

149. Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem.* 277(51):49212-9.
150. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS. (2003) Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem.* 89(3):462-73.
151. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. (2004) Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood.* 104(2):565-71.
152. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature.* 393(6685):591-4.
153. Takahama Y. (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 6(2):127-35. Revue.
154. Takaya J, Fujii Y, Higashino H, Taniuchi S, Nakamura M, Kaneko K. (2009) A case of WHIM syndrome associated with diabetes and hypothyroidism. *Pediatr Diabetes.* 10(7):484-6.
155. Tarakhovsky A. (1997) Bar Mitzvah for B-1 cells: how will they grow up? *J Exp Med.* 185(6):981-4.
156. Tassone L, Moratto D, Vermi W, De Francesco M, Notarangelo LD, Porta F, Lougaris V, Facchetti F, Plebani A, Badolato R. (2010) Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood.* 116(23):4870-3.
157. Tassone L, Notarangelo LD, Bonomi V, Savoldi G, Sensi A, Soresina A, Smith CI, Porta F, Plebani A, Notarangelo LD, Badolato R. (2009) Clinical and genetic diagnosis of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome in 10 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 123(5):1170-3, 1173.e1-3.
158. Trampont PC, Tosello-Trampont AC, Shen Y, Duley AK, Sutherland AE, Bender TP, Littman DR, Ravichandran KS. (2010) CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol.* 11(2):162-70.
159. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci.* 115(Pt 12):2603-11.
160. Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. (2005) Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 201(11):1771-80.
161. Ueno T, Hara K, Willis MS, Malin MA, Höpken UE, Gray DH, Matsushima K, Lipp M, Springer TA, Boyd RL, Yoshie O, Takahama Y. (2002) Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity.* 16(2):205-18.
162. Valenzuela-Fernández A, Planchenault T, Baleux F, Staropoli I, Le-Barillec K, Leduc D, Delaunay T, Lazarini F, Virelizier JL, Chignard M, Pidarv D, Arenzana-Seisdedos F. (2002) Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem.* 277(18):15677-89.
163. Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC, Sakmar TP, Volkman BF. (2006) Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1alpha/CXCL12). *J Mol Biol.* 359(5):1400-9.
164. Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, Martín De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martínez-A C, Mellado M. (1999) The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 13(13):1699-710.
165. Voermans C, Anthony EC, Mul E, van der Schoot E, Hordijk P. (2001) SDF-1-induced actin polymerization and migration in human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 29(12):1456-64.
166. Wald O, Pappo O, Ari ZB, Azzaria E, Wiess ID, Gafnovitch I, Wald H, Spengler U, Galun E, Peled A. (2004) The CCR5Delta32 allele is associated with reduced liver inflammation in hepatitis C virus infection. *Eur J Immunogenet.* 31(6):249-52.
167. Walters KB, Green JM, Surfus JC, Yoo SK, Huttenlocher A. (2010) Live imaging of neutrophil motility in a zebrafish model of WHIM syndrome. *Blood.* 116(15):2803-11.
168. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, Jacques Y, Baratin

M, Tomasello E, Vivier E. (2007) Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol.* 8(12):1337-44.

169. Wang A, Fairhurst AM, Tus K, Subramanian S, Liu Y, Lin F, Igarashi P, Zhou XJ, Batteux F, Wong D, Wakeland EK, Mohan C. (2009) CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus. *J Immunol.* 182(7):4448-58.

170. Wang J, Babcock GJ, Choe H, Farzan M, Sodroski J, Gabuzda D. (2004) N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology.* 324(1):140-50.

171. Wang J, Guan E, Roderiquez G, Calvert V, Alvarez R, Norcross MA. (2001) Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J Biol Chem.* 276(52):49236-43.

172. Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL, Michael NL. (1998) Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem.* 273(8):4754-60.

173. Weston B, Todd RF 3rd, Axtell R, Balazovich K, Stewart J, Locey BJ, Mayo-Bond L, Loos P, Hutchinson R, Boxer LA. (1991) Severe congenital neutropenia: clinical effects and neutrophil function during treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Lab Clin Med.* 117(4):282-90.

174. Wetzler M, Talpaz M, Kellagher MJ, Gutterman JU, Kurzrock R. (1992) Myelokathexis: normalization of neutrophil counts and morphology by GM-CSF. *JAMA.* 267(16):2179-80.