

**Université de Limoges**

**ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)**

**EA3842 – Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique**

Thèse pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie-Oncologie

Présentée et soutenue par

**Hugo Talbot**

Le 19 décembre 2018

**Résistance des lymphocytes B à la mort cellulaire au cours de la leucémie lymphoïde chronique : implications d'une neurotrophine, le BDNF, du récepteur de la neurotensine, NTSR2, et des « nurse-like cells ».**

Thèse co-dirigée par Pr Marie-Odile JAUBERTEAU et Pr Anne-Laure FAUCHAIS

Rapporteurs

Pr Yves RENAUDINEAU, INSERM U1227, Université de Brest

Pr Jean-Philippe MERLIO, INSERM U1053, Université de Bordeaux

Examineurs

Pr Danielle TROUTAUD, EA3842, Université de Limoges

Pr Jacques ROBERT, INSERM U 1218, Université de Bordeaux

Pr Anne-Laure FAUCHAIS, EA3842, Université de Limoges

Pr Marie-Odile JAUBERTEAU, EA3842, Université de Limoges





*A ma famille,  
mes amis,  
et tous ceux qui ont contribué,  
de près ou de loin,  
à l'aboutissement de ce travail*

*Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.*

**Marie Curie**

## Remerciements

---

Je tiens dans un premier temps à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury. Aux rapporteurs **Jean-Philippe Merlio** et **Yves Renaudineau**, merci de m'avoir fait l'honneur de consacrer du temps à la lecture et l'évaluation de mes travaux. Toute ma reconnaissance également aux examinateurs **Jacques Robert**, **Marie-Odile Jauberteau** et **Anne-Laure Fauchais** pour participer à ce jury. Enfin, toute ma gratitude à **Danielle Troutaud** de me faire l'honneur et le plaisir de présider ce jury.

Ces trois années de thèse ont été une véritable aventure, scientifique et humaine, qui m'aura radicalement changé. J'aimerais ensuite remercier toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible, ainsi que toutes celles qui ont croisé ma route et ont contribué à mon épanouissement professionnel et personnel.

Je remercie chaleureusement mes directrices de thèse **Marie-Odile Jauberteau** et **Anne-Laure Fauchais**, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et pour votre encadrement. Votre passion et votre dévouement pour la recherche sont une source d'inspiration quotidienne. Merci pour vos précieux conseils ainsi que pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées tout au long de ces trois années tout en gardant toujours un œil avisé sur l'avancé du sujet. Vos encouragements et votre émerveillement à chaque résultat important m'ont procuré la force nécessaire pour aller toujours plus loin, et vous en serai éternellement reconnaissant.

Merci à la **Ligue Contre le Cancer**, à la **région Limousin**, au **Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie** (CORC) et au **Fonds Européen de Développement Régional** (FEDER) pour le soutien financier dont a bénéficié ce projet.

**Une pensée toute particulière aux patients**, nos travaux ont été réalisés en gardant à l'esprit que leur but premier est d'améliorer la connaissance et la prise en charge de cette pathologie, mais rien n'aurait été possible sans leur participation à cette étude. Nous sommes de tout cœur avec eux dans leur combat.

Un grand merci aux membres du personnel, techniciens, ingénieurs, internes et cliniciens du service d'**Hématologie Clinique** du **CHU de Limoges**, qui ont pris le temps, tous les jours, de me signaler tous les prélèvements sanguins de patients, et ont ainsi contribué à l'ensemble des travaux de cette thèse.

Merci à **Nathalie Gachard** pour la mise en place d'une collaboration autour de ces travaux et pour la relecture et les critiques constructives lors de la rédaction des articles. Merci également au service d'**Anatomo-Pathologie**, et particulièrement à **Alain Chauvanel**, pour m'avoir permis de récupérer les biopsies ganglionnaires. Je remercie **Claire Carrion** pour son aide technique lors de l'utilisation du microscope confocal, ainsi que **Nolga** qui a toujours accepté avec le sourire d'être dérangée pour réaliser des prélèvements sanguins. Merci au **personnel de la loge**, et particulièrement **Isabelle**, pour nous accueillir toujours dans la bonne humeur. Toute ma reconnaissance à **Anne-Marie Ferreira** pour sa disponibilité et serviabilité lors de l'organisation de chaque déplacement en congrès et à chaque problème de commande.

Merci infiniment à tous les membres de l'équipe **EA3842 CAPTuR**, vous m'avez accompagné au cours de ces trois années et je pense qu'on a formé une équipe unique en son genre.

Tout particulièrement, merci à **Amazigh**, mon binôme pendant près de deux ans ! Malgré nos caractères très différents on a réussi à travailler ensemble et à se soutenir un maximum, du début de ma thèse à la fin de la tienne. Et ça s'est conclu de la plus belle des façons par la publication de notre article. Ça a été un plaisir de travailler avec toi, et je te souhaite tout le meilleur pour la suite même si tu as déjà l'air bien installé avec ton CDI à Brive.

Un très grand merci à « mon petit » **Sofiane**, qui m'a pris sous son aile dès mon arrivée au laboratoire pour me former. J'ai eu énormément de mal à cerner ton humour au départ, mais ce n'en est que plus drôle aujourd'hui. Merci d'avoir continué à m'épauler à ton retour des États-Unis, la fin de ma thèse et le futur second article n'auraient pas été les mêmes sans toi.

Je remercie énormément **Thomas** (« à fond ou pas à fond ? ») pour toute ton implication dans la mise en forme et la rédaction de l'article, tes conseils scientifiques précieux tout au long de ma thèse, mais également pour ton esprit d'équipe et de partage.

Je remercie tous les statutaires de l'équipe. Merci à **François** pour toutes ses blagues (lourdes), ses relectures d'articles, ses nombreux conseils de manipulations et pour prendre part à la suite du projet sur la LLC. Merci à **Mireille** pour sa bonne humeur entrecoupée de râleries et pour faire vivre le labo en organisant présentations et workshops, à **Danielle** pour sa bienveillance et pour avoir suivi l'avancée de ma thèse. Merci à **Fabrice**, pour son dévouement sans pareil, toujours en train de courir à droite à gauche

entre création de nouveaux projets et cours à la FST. Merci à **Barbara, Gaëlle et Serge** pour toutes les discussions, toujours dans la bonne humeur, que nous avons pu avoir autour du repas de midi ou aux pauses café. Un grand merci à **Aurélie** pour ta gentillesse, pour tout ce dont tu t'occupes, sans quoi l'équipe serait paralysée et pour supporter nos questions incessantes pour les commandes de produits. Merci également à Philippe pour la gestion des commandes et de l'entretien de l'équipement.

Je remercie profondément tous mes collègues doctorants et post-doctorants de l'EA3842, on aura passé tellement de bons moments ensemble. **Hafidha, Sophie et Sabrina**, merci pour tous les moments et les délires qu'on a pu partager au labo et en dehors. **Hafidha** tu es la meilleure voisine de bureau dont je pouvais rêver, merci pour toutes les longues discussions, scientifiques ou autre, et pour ton soutien indéfectible. Merci **Marine** pour ton dynamisme et ta bonne humeur, **Camille** pour les discussions scientifiques en salle de culture, **Éric** pour toutes les blagues...gênantes. **Hussein**, j'ai toujours de temps en temps certaines de tes chansons improvisées qui me reviennent en tête...à ton prochain passage à Limoges t'auras droit à des burgers maisons ! Merci **Niko** de m'avoir fait voir la recherche sous un nouveau jour, pour les coups de gueules dans les couloirs, mais « tout va bien ». **Axel « Toto » Boukredine**, merci pour toutes les discussions et surtout les conneries qu'on a raconté dans le bureau ou au café, pour m'avoir fait découvrir Sandman et tout simplement pour être toi. Merci également à **Amandine, Simon, Clément, Niki, Safaé, Élise, Alexandre** et aux nouveaux thésard **Céline, Aude et Tarek**. Vous avez toutes et tous contribué à rendre mon passage dans cette équipe une expérience inoubliable.

Merci infiniment **Ana** pour tout ce que tu fais, dans l'altruisme le plus total, pour l'ensemble de cette équipe. Ton sourire et ta bonne humeur permanente illuminent les couloirs de ce laboratoire.

Tout le groupe de l'asso **ADPlim, Martial** (pôle évènementiel forever !), **Ben, Florian, Azra, Sylvain, Hichem**, et anciennement **Alexis, Caroline, Jessica et Gaëtan**, on a réussi à organiser quelques évènements très sympas avec l'ensemble des doctorants, et merci pour toutes les réunions, constructives et arrosées.

Pour toutes les soirées, bienvenues pour déstresser, merci à toute la bande de potes, **Sabrina, Martial, Ophélie, Benoît, Justin, Flavien, Robin, Fédérica, Axel...Martial**, dieu vendéen de la mogette et du Cointreau, tout le meilleur pour ton séjour aux States. **Ophélie et Justin**, merci pour le week-end à Arcachon. **Benoît** merci de nous avoir fait découvrir le CSP. **Fédé** bon courage pour la fin de ta thèse, **Flavien** pareil pour Pharma...et la nouvelle saison de foot. **Robin** ... plein de guilis !

Plus que tout, MERCI **Sabrina** ! Je pense être incapable de trouver les mots qui te rendront justice. Du M2 à Poitiers où on ne se connaissait pas vraiment on s'est retrouvés collègues en thèse à Limoges et rapidement les meilleurs des amis, les Tic et Tac du laboratoire. Merci pour tout ce qu'on a partagé, les discussions sur ma thèse, la tienne, les papiers, les soutiens mutuels, les délires, les chats, les pingouins, le bad', les vacances dans le Cantal, les Chouffes... Merci pour avoir égayé ces trois ans de thèse. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la fin de ta thèse et la suite.

Enfin, je remercie **ma famille**, mes parents et grands-parents, mon frère et ma sœur. Merci de m'avoir soutenu pendant ces trois ans, et de m'avoir parfois écouté parler, longuement, de ma thèse et du labo.



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :  
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »  
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Liste des abréviations .....	13
Table des figures .....	16
Table des tableaux .....	18
Introduction et objectifs .....	19
Revue bibliographique .....	21
Chapitre I. La leucémie lymphoïde chronique.....	22
I.1. Définition et épidémiologie .....	22
I.1.1. Définition.....	22
I.1.2. Épidémiologie.....	22
I.2. Origine de la LLC.....	23
I.2.1. Les facteurs de risques .....	23
I.2.2. La lymphocytose B monoclonale.....	24
I.2.3. Rôle de la stimulation antigénique.....	25
I.2.4. La cellule souche de la leucémie lymphoïde chronique.....	26
I.3. Caractéristiques physiologiques des LB-LLC .....	27
I.3.1. Résistance à l'apoptose .....	27
I.3.2. La prolifération .....	29
I.3.3. La voie de signalisation du BCR .....	31
I.3.3.1. La signalisation du BCR dans les LB normaux.....	31
I.3.3.2. La signalisation du BCR dans la LLC .....	34
I.4. Le diagnostic de la LLC.....	35
I.5. Les facteurs pronostiques.....	37
I.5.1. Les classifications cliniques .....	38
I.5.1.1. La classification de Rai .....	38
I.5.1.2. La classification de Binet.....	39
I.5.1.3. Le temps de doublement lymphocytaire .....	41
I.5.2. Le statut mutationnel IgHV .....	41
I.5.3. L'expression de CD38.....	42
I.5.4. L'expression de ZAP-70.....	43
I.5.5. Les facteurs sériques .....	44
I.5.5.1. La $\beta 2$ microglobuline.....	44
I.5.5.2. La Thymidine Kinase.....	45
I.5.5.3. Le CD23 soluble.....	45
I.5.6. Les anomalies cytogénétiques .....	45
I.5.6.1. La délétion 13q14 .....	46
I.5.6.2. La trisomie 12.....	46
I.5.6.3. La délétion 11q22-23 .....	46
I.5.6.4. La délétion 17p13 .....	47
I.5.6.5. Le gain 2p.....	47
I.5.6.6. Le caryotype complexe .....	48
I.5.6.7. Autres anomalies cytogénétiques .....	48
I.5.7. Les mutations récurrentes.....	50
I.5.7.1. Mutation de <i>TP53</i> .....	50
I.5.7.2. Mutation de <i>NOTCH1</i> .....	50
I.5.7.3. Mutation de <i>SF3B1</i> .....	51
I.5.7.4. Mutation de <i>MYD88</i> .....	51

I.5.7.5. Mutation de <i>ATM</i> .....	51
I.5.7.6. Mutation de <i>BIRC3</i> .....	52
I.5.8. L'index de pronostic international pour les patients atteints de LLC (IPI-CLL) ...	52
I.6. L'évolution de la maladie.....	53
I.7. Les traitements de la LLC.....	54
I.7.1. Les chimio-immunothérapies FCR et BR.....	55
I.7.2. Les nouvelles thérapies ciblées.....	56
I.7.3. La thérapie individualisée de la LLC.....	59
Chapitre II. Le microenvironnement tumoral de la Leucémie Lymphoïde Chronique.....	62
II.1. Le microenvironnement et la progression tumorale.....	62
II.2. Les acteurs du microenvironnement tumoral et leurs mécanismes d'action.....	63
II.3. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM).....	65
II.3.1. Les macrophages.....	65
II.3.2. Les macrophages dans les tumeurs.....	66
II.3.2.1. Origine et différenciation des macrophages.....	66
II.3.2.2. Fonctions des TAMs.....	68
II.3.2.3. Macrophages et thérapies.....	71
II.3.3. Les « nurse-like cells », les TAMs spécifiques de la LLC.....	73
II.4. Le microenvironnement de la leucémie lymphoïde chronique.....	74
II.4.1. Le <i>homing</i> des LB-LLC au sein du microenvironnement.....	75
II.4.2. Support de la survie et de la prolifération des LB-LLC.....	76
II.4.3. Microenvironnement et échappement immunitaire.....	79
II.4.4. Microenvironnement et résistance thérapeutique.....	81
II.4.5. Le microenvironnement comme cible thérapeutique.....	82
Chapitre III. Les neurotrophines, la neurotensine et leurs récepteurs.....	84
III.1. Les neurotrophines et leurs récepteurs.....	84
III.1.1. Les neurotrophines.....	84
III.1.2. Les récepteurs des neurotrophines.....	84
III.1.2.1. Les récepteurs Trks.....	84
III.1.2.2. Structures des Trks.....	85
III.1.2.3. Voies de signalisation.....	87
III.1.3. Le récepteur p75 <sup>NTR</sup> .....	88
III.1.4. Les neurotrophines dans les lymphocytes B.....	90
III.1.4.1. Dans les hémopathies malignes B.....	92
III.2. La neurotensine et ses récepteurs.....	94
III.2.1. La neurotensine.....	94
III.2.2. Les récepteurs de la neurotensine.....	95
III.2.2.1. Le récepteur de la neurotensine de type 1 (NTSR1).....	95
III.2.2.2. Le récepteur de la neurotensine de type 2 (NTSR2).....	97
III.2.2.3. La Sortiline.....	99
III.2.3. La neurotensine et ses récepteurs dans les cancers.....	100
III.2.4. La neurotensine et ses récepteurs dans le système immunitaire.....	102
III.2.4.1. Dans les lymphocytes B et les macrophages.....	103
III.3. Interactions RCPGs / Trks.....	104
III.4. Ciblage thérapeutique des voies des neurotrophines et de la neurotensine.....	106
III.4.1. Ciblage thérapeutique de la voie de la neurotensine.....	106
III.4.2. Ciblage thérapeutique de la voie des neurotrophines.....	108
Résultats.....	110
V.1. Préambule article 1.....	110
V.2. Article 1.....	111

V.3. Préambule article 2.....	129
V.4. Article 2.....	130
V.5. Résultats complémentaires et perspectives à court terme .....	151
Discussion.....	161
Conclusion et perspectives .....	167
Références bibliographiques.....	170
Annexe 1 : Review « Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes » .....	228

## Liste des abréviations

---

<b>β2-m</b> : β2-microglobuline	<b>FCR</b> : Fludarabine Cyclophosphamide
<b>5-FU</b> : 5-fluorouracile	Rituximab
<b>ACP1</b> : Acid Phosphatase 1	<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factor
<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>FISH</b> : Hybridation In Situ en
<b>AKT</b> : Protéine Kinase B	Fluorescence
<b>ALK</b> : Anaplastic Lymphoma Kinase	<b>FPR</b> : formyl peptide receptor
<b>AP-1</b> : Activating Protein 1	<b>Gab1</b> : Grb2-associated-binding protein-1
<b>APRIL</b> : A Proliferation Inducing Ligand	<b>GM-CSF</b> : Granulocyte Macrophage
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	Colony-Stimulating Factor
<b>BAFF</b> : B-cell Activating Factor	<b>Grb2</b> : Growth factor receptor-bound
<b>Bax</b> : Bcl-2-associated X protein	protein-2
<b>Bcl-2</b> : B-cell lymphoma 2	<b>HER 2/3</b> : Human Epidermal Growth
<b>Bcl-XL</b> : B-cell lymphoma Extra Large	Factor 2/3
<b>Bcl-xs</b> : B-cell lymphoma-extra small	<b>HGF</b> : Hepatocyte Growth Factor
<b>BCMA</b> : B-Cell Maturation Antigen	<b>HIF</b> : Hypoxia-Induced Factor
<b>BCR</b> : B-Cell Receptor	<b>HLA</b> : Human Leukocyte Antigen
<b>BDNF</b> : Brain Derived Growth Factor	<b>HMGB1</b> : High Mobility Group Box 1
<b>BLNK</b> : B-Cell Linker	<b>IDO1</b> : indoleamine 2,3-dioxygénase-1
<b>BR</b> : Bendamustine et Rituximab	<b>IFN-γ</b> : Interféron gamma
<b>Btk</b> : Bruton tyrosine kinase	<b>IgHV</b> : Immunoglobulin Heavy Chain
<b>CCL</b> : Chemokine Ligand	<b>IL</b> : Interleukine
<b>CDC</b> : cytotoxicité dépendante du	<b>IP<sub>3</sub></b> : Inositol 1,4,5 Triphosphate
complément	<b>IPI-CCL</b> : Index de Pronostic
<b>CMH</b> : Complexe Majeur	International pour les patients atteints de
D'histocompatibilité	LLC
<b>CPA</b> : Cellule Présentatrice D'antigène	<b>ITAM</b> : Immunoreceptor Tyrosine-based
<b>CREB</b> : cAMP Response Element Binding	Activation Motif
<b>CSC</b> : Cellules Souches Cancéreuses	<b>JNK</b> : Jun Kinase
<b>CSF-1</b> : Colony Stimulating Factor 1	<b>KO</b> : Knock-Out
<b>CSH</b> : Cellule Souche Hématopoïétique	<b>LB</b> : Lymphocyte B
<b>CSM</b> : Cellules Souches	<b>LB-LLC</b> : Lymphocyte B de Leucémie
Mésenchymateuses	Lymphoïde Chronique
<b>CTLA-4</b> : Cytotoxic T-Lymphocyte	<b>LLC</b> : Leucémie Lymphoïde Chronique
Associated Antigen 4	<b>LPS</b> : Lipopolysaccharide
<b>CXCL</b> : C-X-C motif chemokine	<b>LT</b> : Lymphocyte T
<b>CXCR</b> : C-X-C chemokine receptor	<b>M-MDSC</b> : Monocyte-Related Myeloid-
<b>DAG</b> : Diacylglycerol	Derived Suppressor Cells
<b>DFG</b> : Débit De Filtration Glomérulaire	<b>MAPK</b> : Mitogen-Associated Protein
<b>DLBCL</b> : Lymphome Diffus A Grandes	Kinase
Cellules B	<b>MBL</b> : Lymphocytose B Monoclonale
<b>EGFR</b> : Epidermal Growth Factor	<b>Mcl-1</b> : Myeloid cell leukemia 1
Receptor	<b>MEC</b> : Matrice Extracellulaire
<b>Elk-1</b> : ETS domain-containing protein	<b>MET</b> : Microenvironnement Tumoral
Elk-1	<b>miR</b> : micro RNA
<b>ERK</b> : Extracellular Signal-Regulated	<b>MMP</b> : Métalloprotéases Matricielles
Kinase	<b>NADE</b> : NT-associated cell death receptor
<b>FAK</b> : Focal Adhesion Kinase	

**NAMPT** : Nicotinamide Phosphoribosyltransférase  
**NCOA1** : Nuclear Receptor Coactivator 1  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor kappa- light-chain-enhancer of activated B cells  
**NFAT** : Nuclear Factor of Activated T-cells  
**NFS** : Numération Formule Sanguine  
**NGF** : Nerve Growth Factor  
**NGFR** : NGF Receptor  
**NK** : Natural Killer  
**NLC** : Nurse-Like Cell  
**NMN** : Neuromédine N  
**NRAGE** : NT-Receptor Interacting MAGE Homolog  
**NRIF** : NT-Receptor Interacting Factor  
**NT** : Neurotrophine  
**NT-3** : Neurotrophin 3  
**NT-4/5** : Neurotrophin 4/5  
**NTRK** : Neurotrophin Receptor Kinase  
**NTS** : Neurotensine  
**NTSR1** : Neurotensin Receptor 1  
**NTSR2** : Neurotensin Receptor 2  
**p75<sup>NTR</sup>** : Neurotrophin Receptor p75  
**PACAP** : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide  
**PD-1** : Programmed cell Death protein 1  
**PD-L1** : Programmed Death-1 Ligand 1  
**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor  
**PDK1** : 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1  
**PDZ** : Post-synaptic Disc-large Zona  
**PI3K** : Phosphatidylinositol-3 Kinase  
**PKC** : Protéine Kinase C  
**PLC** : Phospholipase C  
**PTX** : Toxine Pertussique  
**Raf** : Raf kinase  
**RAGE** : Receptor for Advanced Glycation End-product  
**Ras** : Ras GTPase activating protein  
**RCPG** : Récepteur Couplé Aux Protéines G  
**ROCK2** : Rho-Associated Protein Kinase 2  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RS** : Syndrome de Richter  
**RTK** : Recepteur Tyrosine Kinase  
**Shc** : Src homology-2 domain-containing protein  
**SHM** : Hypermutation Somatique

**siRNA** : silencing RNA  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**SOS** : Son Of Sevenless  
**STAT3** : Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
**STAT5** : Signal Transducer and Activator of Transcription 5  
**TACI** : Transmembrane Interactor and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor  
**TAM** : Macrophage Associé aux Tumeurs  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor beta  
**Th1-2** : Lymphocyte T helper 1 ou 2  
**TK** : Thymidine Kinase  
**TLR** : Toll-Like Receptor  
**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor alpha  
**TRAF** : TNF Receptor-Associated Factors  
**Trk** : Tropomyosin related kinase  
**VDJ** : Variable Diversity Joining  
**VEGF-A** : Vascular Endothelial Growth Factor A  
**VLA-4** : Very Late Antigen-4  
**Vps10** : Vacuolar Protein Sorting 10  
**ZAP-70** : Zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa



## Table des figures

Figure 1 : Incidence de la LLC .....	23
Figure 2 : Modèle de développement de la LLC à partir des LB de la zone marginale.....	26
Figure 3 : Modèle de développement de la LLC à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSCs).....	27
Figure 4 : Modèle de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2. ....	28
Figure 5 : La signalisation du BCR.....	33
Figure 6 : Étalement sanguin d'une LLC. ....	36
Figure 7 : Survie globale des patients atteints de LLC selon les classifications de Binet (A) et de Rai (B).....	41
Figure 8 : Courbe de survie sans progression (A) et survie globale (B) selon le pourcentage de mutation <i>IGHV</i> (de 0% à 9% et plus).....	42
Figure 9 : Les facteurs pronostiques CD38, ZAP-70 et mutation de <i>IGHV</i> .....	44
Figure 10 : Représentation du bras 2p du chromosome 2 et localisation des gènes dérégulés lors du gain 2p ainsi que du gène <i>NTSR2</i> . ....	48
Figure 11 : Survie globale selon le groupe de risque CLL-IPI.....	53
Figure 12 : Ciblage thérapeutique de voies de signalisation spécifiques pour le traitement de la LLC. ....	57
Figure 13 : Approche thérapeutique individualisée pour les patients atteints de LLC. ....	61
Figure 14 : Caractéristiques des cellules tumorales dans leur microenvironnement. ....	62
Figure 15 : Le microenvironnement tumoral.....	63
Figure 16 : Polarisation et phénotypes M1/M2.....	66
Figure 17 : Origine, différenciation et fonctions des macrophages associés aux tumeurs.....	71
Figure 18 : Stratégie de ciblage thérapeutique des TAMs.....	73
Figure 19 : Le microenvironnement de la leucémie lymphoïde chronique.....	75
Figure 20 : Interaction des neurotrophines avec les récepteurs Trk.....	85
Figure 21 : Structure des récepteurs Trk. ....	85
Figure 22 : Isoformes des récepteurs Trks.....	86
Figure 23 : Les voies de signalisation activées par les récepteurs Trks.....	87
Figure 24 : Signalisation par p75 <sup>NTR</sup> .....	89
Figure 25 : Clivage de la pro-NTS en Neurotensine et Neuromédine N.....	94
Figure 26 : Structure des récepteurs NTSR1 et NTSR2.....	96
Figure 27 : Voies de signalisations induites par NTSR1 et inhibiteurs associés (en rouge)....	97
Figure 28 : Voies de transport de la sortiline.....	99
Figure 29 : Voies de signalisations induites par la neurotensine et ses récepteurs NTSR1 et sortiline.....	102



Figure 30 : Mécanismes de transactivation des RTKs et des RCPGs.....	105
Figure 31 : Analyse des interactions potentielles de la sortiline (SORT1) selon la base de données "String-database".....	152
Figure 32 : Mécanismes de signalisation impliquant TRAF6.....	153
Figure 33 : Interactions de la sortiline avec BAFF-R, TRAF6 et CXCR4.....	154
Figure 34 : Co-localisation de la sortiline avec TACI, TRAF6 et BAFF-R dans les LB-CLL et avec BAFF et APRIL dans les NLC.....	156
Figure 35 : Expression de la sortiline, du BDNF et des récepteurs NTSR2 et TrkB par les NLCs.....	158

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Score de Matutes.....	37
Tableau 2 : Classification de Rai version originale .....	39
Tableau 3 : Classification de Rai révisée .....	39
Tableau 4 : Classification de Binet .....	40
Tableau 5 : Résumé des anomalies cytogénétiques fréquentes dans les cas de LLC et leurs effets biologiques et pronostiques associés. ....	50
Tableau 6 : Modèle multivarié CLL-IPI.....	52
Tableau 7: Expression et implication des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les lymphocytes B. ....	92

## Introduction et objectifs

---

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation de lymphocytes B matures monoclonaux résistants à l'apoptose dans la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (Chiorazzi et al., 2005; Kipps et al., 2017). Le microenvironnement tumoral (MET) de la LLC favorise la survie, la prolifération et l'échappement immunitaire de cellules leucémiques (Burger, 2011). Les thérapies actuellement utilisées pour traiter les patients atteints de LLC ciblent les voies de signalisation pro-survie, particulièrement celle induite par le B-cell receptor (BCR). Malgré leur remarquable efficacité dans la majorité des cas, de nombreux cas de résistances thérapeutiques et de récives ont été rapportés. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc d'un enjeu capital dans le but d'améliorer la prise en charge thérapeutique de ces patients.

Dans ce contexte le laboratoire au sein duquel ont été réalisés ces travaux s'intéresse tout particulièrement à l'implication de neuropeptides, la neurotensine (NTS) et les neurotrophines (NTs), ainsi que leurs récepteurs associés, dans les processus oncogéniques.

La NTS est un neuropeptide de 13 acides aminés, jouant un rôle de neurotransmetteur au niveau des systèmes nerveux et digestifs (Bozzola et al., 1998; Carraway and Leeman, 1976; Iguchi et al., 1984; Remaury et al., 2002). La NTS exerce ses effet par l'activation de trois récepteurs, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) NTSR1 (*Neurotensin Receptor type 1*) et NTSR2, et un récepteur de type 1, de la famille des récepteurs à domaines Vps10 (*Vacuolar protein sorting 10*), la sortiline. La NTS est ainsi impliquée dans la survie et la prolifération des cellules, mais également leur migration et les mécanismes d'invasion. Son implication dans les cancers a surtout été décrite par l'activation de NTSR1 dans les cancers solides (Alifano et al., 2010; Dupouy et al., 2011; Swift et al., 2010). Le récepteur NTSR2 n'a quant à lui été que peu décrit dans les cancers (Ayala-Sarmiento et al., 2015; Swift et al., 2010).

La famille des NTs comprend quatre membres, le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (Neurotrophin-3) et NT-4/5 (Neurotrophin-4/5). Chaque NT se lie à un récepteur Trk (*Tropomyosin related kinase*) de haute affinité, TrkA pour NGF, TrkB pour BDNF et NT-4/5, et TrkC pour NT-3, induisant des voies de signalisation pro-survie (Arévalo and Wu, 2006; Bergman et al., 2000; Cassiman et al., 2001; Chao, 2003; Kerschensteiner et al., 1999; Sternini et al., 1996). Les NTs sont

synthétisées sous formes immatures, qui sont capables de se lier au récepteur p75<sup>NTR</sup> (*p75 neurotrophin receptor*) pour induire la mort cellulaire (Nykjaer et al., 2005). La sortiline, en plus de son rôle de récepteur de la NTS, est également une protéine de transport intracellulaire, impliquée dans le transport des NTs et de leurs récepteurs (Nykjaer and Willnow, 2012a; Vaegter et al., 2011) et peut aussi agir comme co-récepteur de mort, avec p75<sup>NTR</sup>, des formes immatures des neurotrophines (Jansen et al., 2007; Nykjaer et al., 2004).

Des travaux sur l'implication de la NTS et des NTs dans les lymphocytes B ont été précédemment réalisés dans notre équipe. La NTS et ses trois récepteurs sont exprimés dans les lymphocytes B. La sortiline exerce une double fonction dans la régulation de la survie des lymphocytes B. Elle participe à la mise en place d'une boucle autocrine de survie lors d'un stress cellulaire. Dans ce cas la sortiline transporte le BDNF vers la membrane plasmique où il est sécrété puis induit la survie des cellules par sa liaison au récepteur TrkB membranaire (Fauchais et al., 2008). A l'inverse, la sortiline peut également agir en tant que co-récepteur de p75<sup>NTR</sup> pour la fixation du pro-BDNF qui induit la mort cellulaire (Bellanger et al., 2011; Fauchais et al., 2008). Concernant les hémopathies malignes, notre équipe a montré l'implication de l'axe TrkB-BDNF dans la pathogénèse du lymphome diffus à grandes cellules B (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015). Par ailleurs, il a été déterminé que les lymphocytes B de LLC (LB-LLC) surexpriment le récepteur NTSR2, tandis que l'expression de la NTS y est indétectable et celle de NTSR1 fortement diminuée (Saada et al., 2012).

Suite à cette observation, nous émettons l'hypothèse que le récepteur NTSR2 et le couple BDNF/TrkB seraient impliqués dans la résistance des LB-LLC à l'apoptose. Les fonctions de NTSR2 et de BDNF/TrkB dans les LLC n'ayant jamais été étudiées nos objectifs sont :

- I) De confirmer le rôle anti-apoptotique de NTSR2 dans les cellules leucémiques, caractériser les mécanismes d'activation de ce récepteur et les voies de signalisation qui lui sont associées
- II) D'étudier les interactions éventuelles entre les voies pro-survie induites par NTSR2 et par BDNF/TrkB
- III) D'évaluer l'implication éventuelle des cellules du microenvironnement tumoral, principalement des *Nurse-like cells* dans l'activation des voies de survie des LB-LLC dépendantes des signalisations neurotrophiques et neurotensinergiques.

## Revue bibliographique

---

## Chapitre I. La leucémie lymphoïde chronique

---

### I.1. Définition et épidémiologie

#### I.1.1. Définition

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation, lente et progressive, de lymphocytes B (LB) néoplasiques CD5<sup>+</sup> d'aspect mature (ronds à légèrement irréguliers) dans le sang périphérique, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate (Chiorazzi et al., 2005; Rozman and Montserrat, 1995). La LLC est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé par une hyperlymphocytose supérieure à 5000/mm<sup>3</sup> de LB monoclonaux présentant un phénotype de LB de LLC (LB-LLC), CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>high</sup>, CD20<sup>low</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD79b<sup>low</sup>, smIg<sup>low</sup> et FMC7<sup>-</sup> (Hallek et al., 2008; Matutes et al., 1994; Swerdlow et al., 2016).

#### I.1.2. Épidémiologie

La LLC est la forme de leucémie la plus commune dans les pays occidentaux, où elle représente environ 40% de toutes les leucémies chez les personnes de plus de 65 ans. L'âge médian lors du diagnostic est de 72 ans, seulement 10% environ des patients ont moins de 55 ans, avec environ 60% d'hommes pour 40% de femmes. L'incidence mondiale standardisée est de 4,4 pour 100 000 individus/an pour les hommes et 2,2 pour les femmes (Eichhorst et al., 2011; Rozman and Montserrat, 1995). En France, une étude de l'Institut de Veille Sanitaire estime à 4464 le nombre de nouveaux cas en 2012.

Selon les chiffres de l'institut « Cancer Research UK », au Royaume-Uni, 3709 nouveaux cas ont été recensés en 2015, avec 63% d'hommes et 37% de femmes. L'incidence augmente selon l'âge avec moins de 1/100000 en dessous de 45 ans jusqu'à atteindre 57 (hommes) et 25 (femmes) /100000 au-delà de 90 ans (Figure 1a). L'incidence a en moyenne augmentée de 18% entre 1993-1995 et 2013-2015, mais est extrêmement variable selon les groupes, 32% pour les 25-49 ans, 22% pour les 50-59 ans, 25% pour les 60-69 ans et 22% pour les 70-79 ans, alors qu'elle reste stable pour les moins de 25 ans et les plus de 80 ans (Figure 1b).

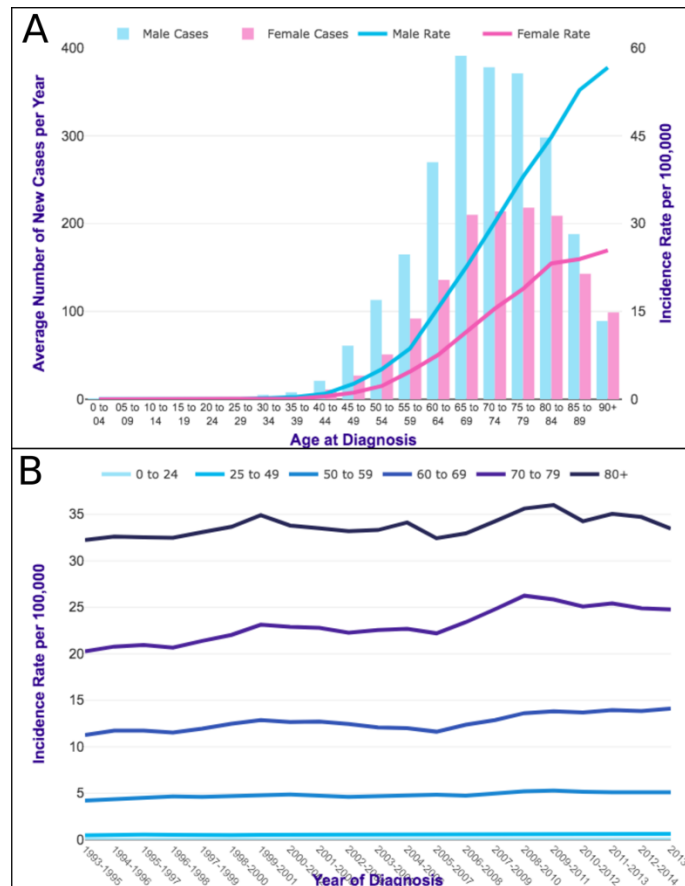


Figure 1 : Incidence de la LLC

A) Incidence de la LLC selon l'âge de diagnostic B) Évolution de l'incidence de la LLC selon les groupes d'âge, de 1993 à 2015. Statistiques disponibles sur le site [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org).

## I.2. Origine de la LLC

### I.2.1. Les facteurs de risques

Il n'existe à ce jour que très peu de preuves de l'influence de facteurs environnementaux et de cancérigènes (composés chimiques ou rayonnements ionisants) sur l'apparition de la LLC. La possible implication d'une exposition au benzène a été rejetée (Rushton et al., 2014), et de même, les personnes immunodéficientes ne développent pas plus fréquemment la LLC (Ghia et al., 2007; Rozman and Montserrat, 1995). Seuls certains herbicides, notamment l'Agent Orange et les pesticides utilisés aux États-Unis de façon intensive augmenteraient les risques de décès des personnes ayant été exposés à ces agents d'un facteur 1,6 à 1,8 (Blair and White, 1985; Brown et al., 1990; Baumann Kreuziger et al., 2014).

Il existe également des formes familiales de LLC. Selon les différentes études, 12% des patients auraient un historique familial de pathologie lymphoproliférative, et 6 à 9% un membre de la famille atteint de LLC. Ces formes familiales auraient un risque 7,5 fois plus élevé d'apparaître comparé aux formes sporadiques, ce qui suggérerait une prédisposition génétique (Brown, 2013; Brown et al., 2008; Capalbo et al., 2000; Goldin et al., 2004; Mauro et al., 2006; Tjønnfjord et al., 2012; Yuille et al., 1998). De plus, plus de 20 polymorphismes ont été identifiés comme possible facteurs de susceptibilité et expliqueraient près de 50% du risque familial (Berndt et al., 2013; Crowther-Swanepoel et al., 2010; Speedy et al., 2014).

L'origine ethnique pourrait également être impliquée dans les risques d'apparition de la LLC. En effet des études ont montré que la LLC avait une incidence moins importante chez les personnes d'origines asiatiques que chez les personnes d'origine caucasienne. En effet la LLC est très rare en Chine et en Corée et presque inexistante au Japon. De plus, cette incidence diminuée est conservée chez les populations migrantes, mais, l'incidence chez les personnes d'origine asiatique ayant émigré aux États-Unis est supérieure à celle de leur pays d'origine, ce qui suggère que, outre les facteurs génétiques, des facteurs environnementaux semblent être également impliqués (Boggs et al., 1987; Clarke et al., 2011; Weiss, 1979).

### **I.2.2. La lymphocytose B monoclonale**

La lymphocytose B monoclonale (MBL) est asymptomatique et est caractérisée par la présence d'une population monoclonale de lymphocytes B dans la circulation, en nombre inférieur à 5000 par mm<sup>3</sup>, chez des patients ne présentant pas de symptômes ou de signes de pathologies lymphoprolifératives, auto-immunes ou infectieuses, ni de LLC (Shanafelt et al., 2010). Dans 75% des cas de MBL, les cellules présentent un phénotype proche de celui des cellules de LLC. Parmi les patients atteints de MBL, 1 à 2% des cas évolueront en LLC. Les cellules de MBL peuvent présenter des anomalies cytogénétiques caractéristiques de la LLC (Rossi et al., 2009a). La seule différence biologique entre la LLC de stade Rai 0 (premier stade de la LLC) et la MBL est le statut mutationnel IgHV (*Immunoglobulin Heavy Variable Chain*) qui est plus souvent muté chez les patients MBL (Morabito et al., 2013). En d'autres termes la seule différence majeure entre la MBL et le premier stade de la LLC est le nombre de lymphocytes accumulés dans la circulation, plus la population est élevée dans la MBL, plus le risque d'évoluer en LLC est grand. Ainsi la MBL est étroitement liée à la LLC et pourrait être considérée comme un stade précoce de LLC (D'Arena and Musto, 2014).



### I.2.3. Rôle de la stimulation antigénique

A la sortie de la moelle osseuse, chaque lymphocyte B mature exprime un récepteur des cellules B, ou BCR, qui lui est propre. La variabilité du répertoire immunitaire de ce BCR est assurée par la variabilité des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines, associées aux mécanismes de recombinaison des chaînes VDJ (*Variable Diversity Joining*) qui a lieu au stade pré-B. La variabilité des chaînes lourdes d'immunoglobulines est due à des mutations hypersomatiques qui peuvent se produire dans le gène *IGHV* ((René et al., 2014).

Les patients atteints de LLC peuvent présenter des clones B avec des gènes *IGHV* mutés ou non, et sont ainsi divisés en deux groupes, les LLC non mutées (U-CLL) et les LLC mutées (M-CLL). Cependant l'état de mutation n'entraîne que peu de différences entre les clones, avec seulement quelques gènes exprimés différemment, contre des milliers par rapport aux LB normaux (Chiorazzi and Ferrarini, 2011), ce qui sous-entend une leucémogénèse commune indépendante du statut mutationnel *IGHV*. Les LB-LLC expriment faiblement des immunoglobulines de surfaces monoclonales, généralement IgM ou IgD, ainsi que les marqueurs CD5 et CD23. Les cellules B de la zone marginale (centre germinatif) sont IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup> avec des gènes *IGHV* mutés (hypermutation somatique) ou non suite à la reconnaissance d'antigènes d'origine bactérienne indépendamment des cellules T. Les LB CD5<sup>+</sup> normaux sont quant à eux capables de produire des immunoglobulines poly-réactives, codées par les mêmes gènes *IGHV* fréquemment exprimés dans les cas de LLC, pouvant reconnaître des antigènes bactériens mais également des auto-antigènes. Tous ces points suggèrent une origine de la LLC dans la zone marginale, les clones de LLC dériveraient de lymphocytes B compétents exposés de façon chronique à des auto-antigènes. Les clones ainsi activés sont sélectionnés pour une expansion clonale, peuvent subir ou non des hypermutations somatiques, ainsi qu'une transformation oncogénique pour donner des clones U-CLL ou M-CLL (Figure 2) (Caligaris-Cappio, 2009; Gaidano et al., 2012; García-Muñoz et al., 2012; Rosén et al., 2010).

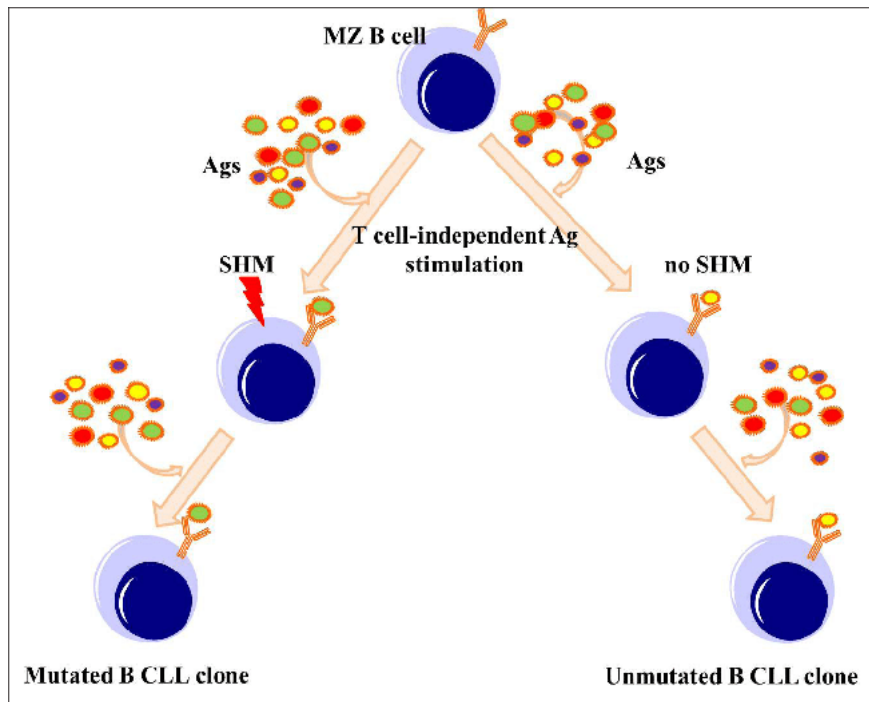


Figure 2 : Modèle de développement de la LLC à partir des LB de la zone marginale.

Les LB de la zone marginale (MZ) peuvent être stimulés par des auto-antigènes, certains d'entre eux peuvent subir des hypermutations somatiques (SHM) et des transformations oncogéniques entraînant l'apparition de clones avec ou sans mutations *IGHV*. D'après Karp and Giannopoulos, 2013.

#### I.2.4. La cellule souche de la leucémie lymphoïde chronique

En opposition avec cette théorie, des travaux récents suggèrent une autre origine de la LLC, les cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Les CSH sont des cellules pluripotentes, à forte capacité d'autorenouveau, capables de se multiplier et se différencier pour générer l'ensemble du système hématopoïétique (Ng and Alexander, 2017). Ces cellules ont une durée de vie très longue et peuvent ainsi accumuler de nombreuses anomalies génétiques qui seront conservées dans les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes qui seront les cibles de la transformation en cellules souches leucémiques dans les cas de leucémies aigues (Rossi et al., 2008).

Dans les cas de LLC, on observe une forte augmentation de la quantité de cellules pro-B  $CD34^+CD38^+$  et  $CD10^+CD19^+$  mais un nombre de CSH  $CD34^+CD38^-$  invariant ce qui suggère que la différenciation des CSH est déviée vers un lignage B. En effet, un nombre élevé de CSH a été identifié comme exprimant des facteurs de transcription lymphoïdes précoces tels que *E2A*, *IKZF1*, et *IRF8*. Ces cellules sont appelées CSH pré-leucémiques, leur capacité d'autorenouveau fait que ces cellules peuvent accumuler, dès ce stade, des

mutations fréquemment observées dans les LB-LLC matures. Les CSH pré-leucémiques vont ensuite générer des pro-B polyclonaux qui seront sélectionnés et amplifiés par activation de leur BCR, donnant naissance à la lymphocytose B monoclonale. Des évènements oncogéniques supplémentaires non identifiés à ce jour entraineront la transformation de ces cellules B en cellules B tumorales de la LLC (Kikushige and Miyamoto, 2014, 2015; Kikushige et al., 2011). Ce modèle suggère donc une origine de la leucémogénèse à partir des CSH qui évolueraient en cellules pré-malignes puis transformées en LB-LLC matures plutôt que la transformation directe de lymphocytes B normaux en lymphocytes B malins (Figure 3).

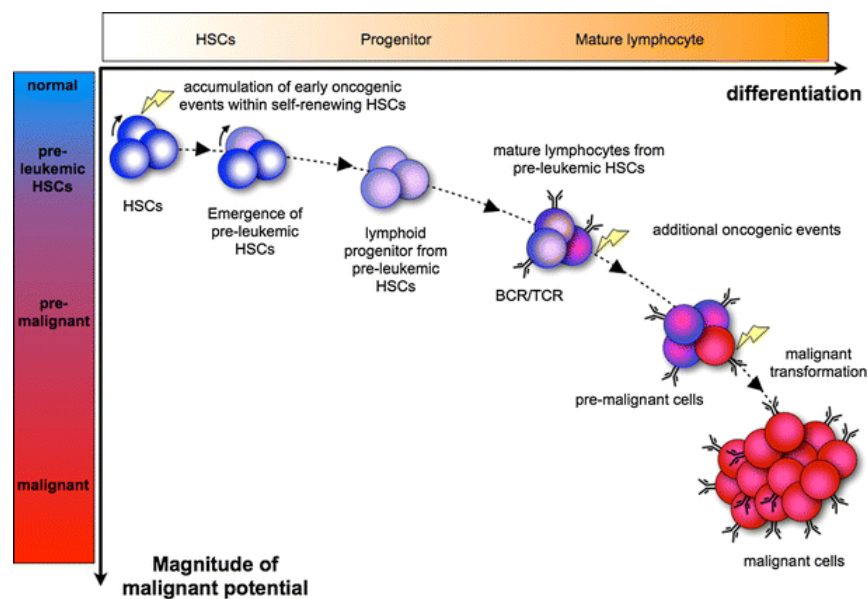


Figure 3 : Modèle de développement de la LLC à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSCs).

Extrait de Kikushige and Miyamoto, 2015

### I.3. Caractéristiques physiologiques des LB-LLC

#### I.3.1. Résistance à l'apoptose

La LLC a longtemps été considérée comme une pathologie due à une accumulation lente et inexorable de LB résistants à la mort programmée ou apoptose, mais la réalité est beaucoup plus complexe et dynamique. Une partie, autour de 1%, des LB-LLC prolifèrent et la balance entre les cellules en prolifération et la mort cellulaire explique l'hétérogénéité d'évolution de la maladie entre les patients (Messmer et al., 2005). Dans la LLC, la régulation de l'apoptose est en grande partie assurée par la famille Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), comprenant des protéines pro et anti-apoptotiques (Faderl et al., 2002; Reed, 1996; Schena et al., 1993). L'un des éléments clés identifiés dans la LLC est la surexpression de la protéine

anti-apoptotique Bcl-2 (Kitada et al., 1998; Pepper et al., 1997, 1998). D'autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) et Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia 1*) sont également surexprimées, alors que les protéines pro-apoptotiques de la même famille, Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et Bcl-xs (*B-cell lymphoma-extra small*) sont sous-exprimées (Dighiero and Hamblin, 2008). Les protéines Bcl-2 et Mcl-1 régulent négativement l'activité des protéines pro-apoptotiques (Figure 4), notamment Bax, ainsi les ratios Bcl-2/Bax et Mcl-1/Bax ont une influence sur la survie des LB-LLC et la progression de la maladie. Des niveaux élevés de Bcl-2 sont de mauvais pronostic pour les patients, avec une survie diminuée ainsi qu'une résistance aux chimiothérapies (Faderl et al., 2002; Robertson et al., 1996). De plus, un polymorphisme commun du gène *BAX* est présent chez de nombreux patients, résultant en une diminution d'expression de Bax et donc des ratios Bcl-2/Bax encore plus importants, associés à une survie significativement plus courte (Starczynski et al., 2005). De son côté, Mcl-1 et notamment le ratio Mcl-1/Bax est associé à une résistance aux traitements au chlorambucil, fludarabine ou rituximab *in vitro* et *in vivo* (Hussain et al., 2007; Pepper et al., 2008) et son inhibition déclenche l'apoptose dans certains modèles de tumeurs de cellules B (Derenne et al., 2002; Michels et al., 2004).

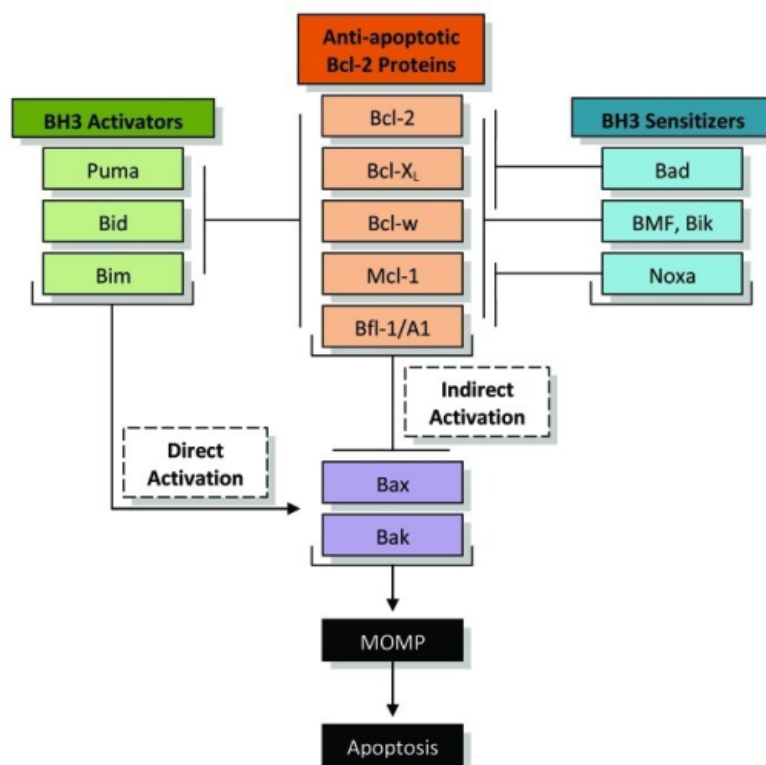


Figure 4 : Modèle de régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2.

D'après Liu and Wang, 2012

Il a été initialement suggéré que la surexpression constitutive de Bcl-2 était due à une hypométhylation du promoteur du gène *BCL2*, entraînant une augmentation de sa transcription et une accumulation de la protéine associée (Hanada et al., 1993). Depuis, il a été découvert chez de nombreux patients, que les micro-RNA (miR) miR-15a et miR-16-1 ayant pour rôle de réguler négativement Bcl-2 au niveau post-transcriptionnel, sont sous exprimés ou délétés (Calin et al., 2005; Cimmino et al., 2005); il en va de même pour miR-29 qui régule Mcl-1 (Munk Pedersen and Reed, 2004). La famille Bcl-2 peut également être régulée par le gène suppresseur de tumeurs *p53*. En effet, les gènes pro-apoptotiques *BAX*, *PUMA*, *NOXA* et *BID* sont des cibles transcriptionnelles directes de *p53* (Miyashita and Reed, 1995; Miyashita et al., 1994; Oda et al., 2000; Sax et al., 2002; Yu et al., 2003). Une étude a ainsi démontré que *p53* stimule la transcription de *PUMA* et *NOXA*, et les protéines associées empêchent les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 de réguler négativement l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Vousden and Lu, 2002). De plus *p53* interagit également avec Bcl-2 et Bax dans le cytoplasme, modulant leur activité. Ainsi, *p53* régule les protéines de la famille Bcl-2 à la fois aux niveaux transcriptionnels et post-traductionnels (Chipuk et al., 2004; Deng et al., 2006). Les mutations ou délétions de *p53* dans la LLC sont courantes et de plus en plus fréquentes selon la progression de la maladie (Tam et al., 2009), il est donc possible d'imaginer qu'une dérégulation de *p53* entrainerait également une dérégulation de la famille Bcl-2 et donc une résistance des LB-LLC à l'apoptose, cela s'accroissant au cours de l'évolution de la maladie (Buggins and Pepper, 2010).

Toutefois, ces cellules résistantes à l'apoptose accumulées *in vivo* entrent rapidement en apoptose *in vitro*. En effet, *ex vivo* les LB-LLC cultivés seuls vont spontanément s'engager dans des voies apoptotiques, mais ce processus est inhibé lorsqu'ils sont cultivés en présence de cellules de leur microenvironnement tumoral (Lagneaux et al., 1998), telles que les cellules mésenchymateuses (Giannoni et al., 2011), les cellules stromales de la moelle osseuse (Lagneaux et al., 1998) ou encore les *Nurse-Like Cells* (NLCs) (Burger et al., 2000). Cela suggère que les signaux pro-survie provenant du microenvironnement sont capitaux dans l'inhibition de l'apoptose (Caligaris-Cappio, 2003; Ghia et al., 2002a, 2005; Munk Pedersen and Reed, 2004).

### **I.3.2. La prolifération**

Historiquement, la LLC a été considérée comme due à une accumulation cellulaire de LB présentant des défauts génétiques entraînant une dérégulation de leurs mécanismes

d'apoptose. En effet, la quasi-totalité des lymphocytes B périphériques de la circulation sanguine sont considérés comme quiescents, car bloqués en phases précoces G0/G1 du cycle cellulaire, et surexpriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Lanasa, 2010). La protéine p27<sup>Kip1</sup>, inhibiteur de kinases dépendantes du cycle cellulaire, est surexprimée dans ces cellules leucémiques, ce qui pourrait expliquer le blocage en phase G0/G1 (Vrhovac et al., 1998).

En réalité, une petite portion des LB-LLC se trouve en état de prolifération, en effet une étude a été réalisée chez des patients LLC ayant ingéré de l'eau deutérée afin de mesurer l'incorporation de cet isotope dans les cellules leucémiques. Cette étude a ainsi montré qu'une population d'environ 0,1 à 1,76% de l'ensemble des LB-LLC prolifèrent, ce qui pourrait représenter au moins 1 million à 1 milliard nouvelles cellules par jour. Un taux de prolifération supérieur à 0,35% des cellules correspondrait à la forme progressive et symptomatique de la maladie (Messmer et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés récemment avec une médiane observée de  $0,39\% \pm 0,21\%$  (Burger et al., 2017). Deux populations peuvent être distinguées, les LB-LLC CD38<sup>+</sup> qui ont une prolifération beaucoup plus importante que les LB-LLC CD38<sup>-</sup> (Calissano et al., 2009a), associés à une expression plus élevée de facteurs de prolifération connus, comme ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa*), Ki67 ou encore la télomérase (Damle et al., 2007). Les télomères des cellules leucémiques sont plus courts que ceux des LB normaux, témoignant de leur activité de prolifération (Rampazzo et al., 2012; Sellmann et al., 2011; Véronèse et al., 2013). De plus, pour les LB-LLC avec *IGHV* non muté, la stimulation du BCR peut engendrer une réponse proliférative (Guarini et al., 2008).

Les cellules leucémiques en prolifération sont observées dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques (Defoiche et al., 2008; van Gent et al., 2008; Hayes et al., 2010; Messmer et al., 2005). La proportion la plus importante de LB-LLC en prolifération est située dans les ganglions lymphatiques, dans des structures histologiques appelées pseudo-follicules. On observe environ cinq fois plus de cellules Ki67<sup>+</sup> dans les ganglions lymphatiques que dans le sang périphérique, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes associés à l'activation du BCR et à la prolifération (Herishanu et al., 2011). Une sous-population particulière a été identifiée, appelée CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*)<sup>Dim</sup>/CD5<sup>Bright</sup>, c'est-à-dire avec une faible expression de CXCR4 et une forte expression de CD5, qui représente la fraction de LB-LLC avec le plus fort potentiel prolifératif (Calissano et al., 2011). Cette population est majoritairement localisée dans les

ganglions lymphatiques où elle correspond aux LB-LLC activés pour proliférer ou aux nouveaux LB-LLC suite à la prolifération. Elle est également détectée en quantité moins importante dans le sang périphérique et la moelle osseuse, l'hypothèse étant que ces cellules ont migré depuis les ganglions (Herndon et al., 2017). Les cellules  $CD5^{high}CXCR4^{low}$  correspondant aux nouvelles cellules expriment des gènes liés à la prolifération, l'activation cellulaire et la signalisation cellulaire, tandis que les cellules  $CD5^{low}CXCR4^{high}$ , correspondant à des cellules « quiescentes » expriment des gènes liés à la régulation de l'apoptose et la migration (Calissano et al., 2009b). Cela suggère une dynamique dans laquelle les cellules périphériques quiescentes surexprimant CXCR4 migrent vers les ganglions où elles seront activées et proliféreront, entraînant une diminution de CXCR4 et le relargage des nouvelles cellules dans la circulation sanguine (Lanasa, 2010). Plus que tout, cela souligne l'importance que joue le microenvironnement tumoral de la LLC, notamment au sein des ganglions lymphatiques, qui délivrent aux cellules leucémiques les chimiokines et cytokines nécessaires à leur survie et leur prolifération (voir Chapitre II).

### **I.3.3. La voie de signalisation du BCR**

#### **I.3.3.1. La signalisation du BCR dans les LB normaux**

Le BCR (Figure 5A) est le récepteur de l'antigène pour les cellules B. C'est un complexe composé d'une immunoglobuline membranaire (IgM) liée de façon non-covalente à un dimère  $CD79a(Ig\alpha)/CD79b(Ig\beta)$  (Reth, 1989). Suite à la fixation d'un antigène soluble ou lié à la membrane sur l'IgM, l'activation du BCR a lieu par la phosphorylation des résidus tyrosine situés sur les motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) intracytoplasmiques de CD79a et CD79b. Cette phosphorylation est réalisée par les kinases Lyn et Syk (Spleen Tyrosine Kinase), de la famille des protéines Src (Rolli et al., 2002; Yamamoto et al., 1993). Elle entraîne le recrutement d'un signalosome (Figure 5B), composé de nombreuses kinases et protéines adaptatrices telles que Syk et Lyn, Bruton tyrosine kinase (Btk), les protéines d'échange de guanine VAV, ou encore les protéines adaptatrices Grb2 et *B-cell linker* (BLNK) (Dal Porto et al., 2004; Kurosaki, 2002; Scharenberg et al., 2007). Le signalosome ainsi formé va déclencher des cascades de signalisations, impliquant notamment l'afflux de calcium, Btk et  $PI3K\delta$  (isoforme delta de la Phosphatidylinositol-3 Kinase). Ainsi l'activation du BCR mature peut induire différents effecteurs en aval en fonction de l'état de maturation de la cellule et de l'antigène se fixant sur le BCR (Figure 5C). L'afflux de calcium active directement les facteurs de transcriptions  $NF-\kappa B$  (*Nuclear Factor kappa-light-chain-*

*enhancer of activated B cells*) et NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (Dolmetsch et al., 1997), tandis que la production de diacylglycerol (DAG) et l'activation de la protéine kinase C (PKC) entraîne l'activation de la voie des MAPK (*Mitogen-Associated Protein Kinase*) (Hashimoto et al., 1998). La voie MAPK peut également être activée directement par VAV et Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein-2*) (Hashimoto et al., 1998). Elle régule l'activation de facteurs de transcription tels que Elk1, c-Myc, ATF2 et Max, qui selon le stade de maturation du LB entraîneront sa survie et sa prolifération, ou son apoptose (Johnson and Lapadat, 2002; Woyach et al., 2012a). NFAT régule la production de cytokines et d'autres effecteurs de la réponse immunitaire (Rao et al., 1997). NF- $\kappa$ B régule des gènes impliqués dans de nombreux processus dans les lymphocytes B, tels que la prolifération, la commutation de classe et la survie des LB matures (Ruland and Mak, 2003; Stadanlick et al., 2008). La voie AKT (*protein kinase B*) peut également être activée par le BCR *via* la PI3K, et AKT aura pour rôle d'augmenter l'accumulation de NFAT et NF- $\kappa$ B au sein du noyau (Bellacosa et al., 1998; Ghosh et al., 1998; Gold et al., 1999) et donc d'amplifier la transcription des gènes associés à ces deux voies.



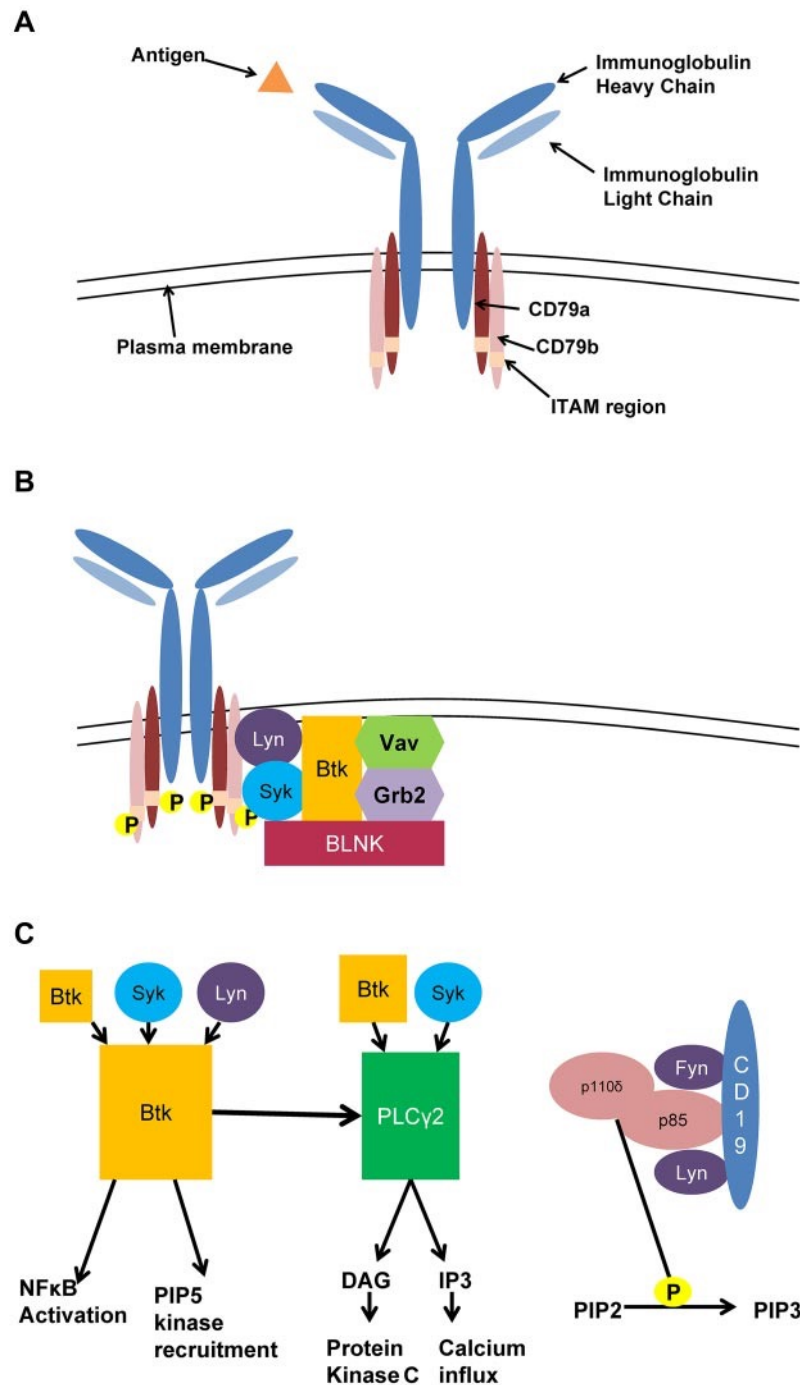


Figure 5 : La signalisation du BCR.

A) Le complexe formé par le BCR. B) Le complexe du signalosome formé suite à l'activation du BCR. C) Signalisation intermédiaire activée par le BCR. Le BCR active Btk, PLC $\gamma$ 2 et PI3K qui activeront en aval les voies AKT, NFAT, NF- $\kappa$ B et MAPK. D'après Woyach et al., 2012a

L'activation du BCR se ferait principalement au niveau des tissus lymphoïdes, et cette activation peut se faire de façon antigène-dépendante, comme décrit précédemment, ou de façon antigène-indépendante, appelée signalisation tonique du BCR. Les cascades de signalisations induites entraînent normalement la prolifération, la différenciation et la

production d'anticorps des LB sélectionnés pour leur réactivité avec un antigène, tandis que les cellules non ou auto-réactives sont éliminées (Goodnow et al., 2005; LeBien and Tedder, 2008).

### **I.3.3.2. La signalisation du BCR dans la LLC**

La survie des lymphocytes B normaux dépend de l'activation de la signalisation du BCR et probablement de la combinaison des signalisations toniques et antigène-dépendantes (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997). Ces deux mécanismes sont également impliqués dans la régulation de la survie et de la prolifération des clones de LB-LLC, mais l'avantage de l'un sur l'autre n'est pas élucidé à ce jour (Burger and Chiorazzi, 2013).

La LLC a une signalisation différente des LB normaux, elle est caractérisée par une expression réduite d'IgM, une réponse variable à la stimulation antigénique, ainsi qu'une activation tonique de voies anti-apoptotiques (Woyach et al., 2012a). Les LB-LLC ont un profil d'expression génique proche de ceux des LB normaux activées par un antigène, ce qui suggère une forte implication de l'activation du BCR dans la pathologie. De plus il a été montré que la protéine ZAP-70, normalement absente de la signalisation BCR, y était impliquée dans la LLC. Elle est surexprimée dans la LLC, et cela de façon plus importante dans les U-CLL (*IGHV* non muté). ZAP-70 joue un rôle de protéine adaptatrice, indépendamment de son rôle classique de kinase (Chen et al., 2008) et augmente la signalisation du BCR par une augmentation du flux calcique (Chen et al., 2002) et potentialise la réponse du BCR suite à la stimulation de l'IgM ; elle permet également une augmentation de la migration des LB-LLC vers le gradient de chimiokines, ainsi que des réponses aux signaux de survie en provenance du microenvironnement (Richardson et al., 2006). Même si ZAP-70 permet d'augmenter la signalisation du BCR, celle-ci est augmentée chez tous les patients LLC, indépendamment de leur expression de ZAP-70 ou de leur statut mutationnel *IGHV* (Herishanu et al., 2011).

Certaines études semblent montrer que la signalisation tonique est dominante. Celle-ci est en effet activée de façon plus importante que dans les LB normaux, les LB-LLC expriment de façon constitutive des formes phosphorylées de Lyn (Contri et al., 2005), Syk (Gobessi et al., 2009), ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) (Muzio et al., 2008) et NF- $\kappa$ B (Hewamana et al., 2008). On observe également une plus forte expression de Btk dans les LB-LLC (Ghia et al., 2002b), de même qu'une activation constitutive de PI3K (Hoellenriegel et al., 2012; Ponader et al., 2012), ce qui renforce l'activation des voies MAPK et NF- $\kappa$ B.

Cependant les différences importantes dans la signalisation BCR selon le statut mutationnel *IGHV* (Fais et al., 1998) et le fait que les patients LLC ne montrent pas (Philippen et al., 2010) ou très rarement (Thompson et al., 1997) de mutations activatrices du BCR, sont des arguments en défaveur de la signalisation tonique. Le BCR pourrait être capable de reconnaître des antigènes variés, soit externes comme des antigènes microbiens ou des auto-antigènes du microenvironnement, soit des auto-antigènes internes comme des composants des chaînes d'immunoglobulines (Hoogeboom et al., 2013; Kostareli et al., 2012; Stoeber et al., 1989). Une hypothèse intégrant les deux mécanismes a été émise selon laquelle l'activation initiale du BCR serait antigène dépendante, afin de sélectionner un clone réactif, puis d'évoluer vers un clone activé de façon antigène-indépendante dans lesquelles les voies de survie et de prolifération persisteraient, induisant l'expansion du clone et donc le développement de la pathologie (Burger and Chiorazzi, 2013; Chiorazzi and Ferrarini, 2003, 2011; Greaves, 2013; Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004; Wu, 2012).

Considérant le rôle capital joué par la signalisation du BCR dans le développement et le maintien des LB-LLC, les protéines impliquées dans cette signalisation ont été, ces dernières années, étudiées en profondeur afin de développer des thérapies ciblées inhibitrices de la signalisation BCR. On peut noter l'utilisation aujourd'hui de plusieurs inhibiteurs tels que l'ibrutinib ou l'acalabrutinib, inhibiteurs de Btk, ou de l'idélalisib, inhibiteur de la PI3K $\delta$ .

#### **I.4. Le diagnostic de la LLC**

Les signes cliniques de la LLC sont minimes et très variables, la plupart des patients atteints de LLC sont en règle générale asymptomatiques et la découverte de la pathologie est dans la majorité des cas fortuite, lors d'un hémogramme de routine et le diagnostic sera confirmé trois mois plus tard (Ghia et al., 2007). Bien que minoritaires, certains patients présentent des signes cliniques qui entraînent une suspicion de LLC, tels que la fatigue, les sueurs nocturnes, la perte de poids, la fièvre, des infections fréquentes, des saignements, des adénopathies, une hépato-splénomégalie et plus rarement une hypertrophie thyroïdienne. Dans des cas extrêmement rares la LLC est identifiée par ses complications auto-immunes, le purpura thrombopénique immunologique ou l'anémie hémolytique auto-immune (Hallek, 2015).

Le diagnostic de la LLC repose sur trois examens, l'hémogramme, le frottis sanguin et l'immunophénotypage du sang périphérique. *L'International Workshop on Chronic*

*Lymphocytic Leukemia* a défini le diagnostic comme suit : une numération formule sanguine (NFS) montrant une hyperlymphocytose B  $\geq 5000$  lymphocytes/mm<sup>3</sup> persistant au moins trois mois, un frottis sanguin présentant de petits lymphocytes morphologiquement matures et un immunophénotypage caractérisé par la co-expression de CD5 associée aux marqueurs de surface des LB CD19, CD20 et CD23 ainsi que l'expression des chaînes légères d'immunoglobuline  $\kappa$  et  $\lambda$  (Cramer et al., 2016; Hallek, 2015). Ces deux examens suffisent généralement à poser le diagnostic de la LLC, sans indications d'examens supplémentaires de type myélogramme, biopsie ostéo-médullaire ou biopsie ganglionnaire. Les LLC ainsi caractérisées sont de type B dans 95%, les 5% restants correspondant à des LLC à lymphocytes T (Schriever and Huhn, 2003).

Le frottis sanguin est réalisé par la coloration May-Grünwald Giemsa et étalement sur lame des cellules sanguines. Chez un patient LLC, le frottis sanguin montre un très grand nombre de petits lymphocytes B, d'aspect mature, et possédant un cytoplasme restreint et un noyau arrondi, dense, sans nucléole, ayant une chromatine partiellement agrégée. Des noyaux nus, aussi appelés ombres de Gümprrecht, correspondant à des cellules leucémiques endommagées au cours de l'étalement du frottis, sont également classiquement observés (Figure 6).

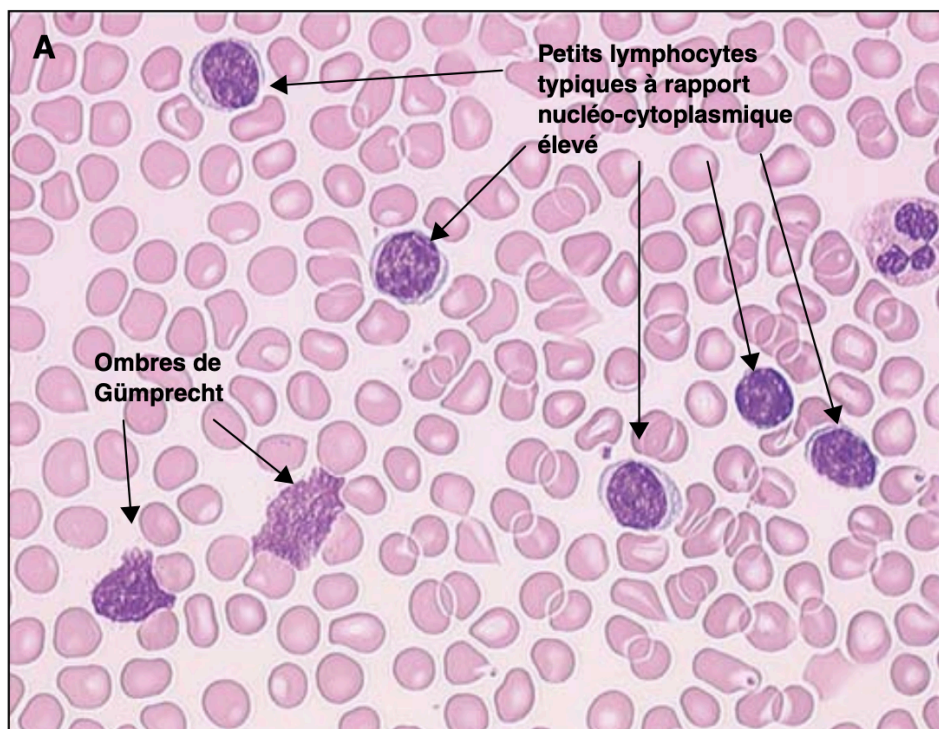


Figure 6 : Étalement sanguin d'une LLC.

Evrard et al, 2005

L'immunophénotypage des lymphocytes sanguins est réalisé par cytométrie en flux. Les cellules leucémiques co-expriment l'antigène des cellules T, le CD5, ainsi que les marqueurs de surface des cellules B CD19, CD20 et CD23. Les niveaux d'expression des immunoglobulines de surfaces (sIg), du CD20, du CD79b et de FMC7 sont significativement plus faibles que ceux des cellules B normales. Les clones leucémiques sont restreints à l'expression d'un seul type de chaînes légères d'immunoglobuline  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Enfin les taux d'expression de CD20 et de CD23 permettent de différencier les clones de LLC d'autres types de pathologies B au phénotype proche (leucémie pro-lymphocytaire, lymphome de la zone marginale) (Hallek, 2017).

L'immunophénotypage permet grâce aux cinq marqueurs CD5, CD23, CD79b (ou CD22), FMC7 et sIg, de calculer le score de Matutes (Matutes et al., 1994) (Tableau 1). Selon l'expression de ces antigènes, un score entre 0 et 5 est déterminé. Un score de 4 ou 5 est en faveur d'un diagnostic de LLC et élimine les autres pathologies connues pour engendrer des hyperlymphocytoses ; un score de 3 correspond généralement à une « LLC atypique ». Les scores inférieurs ou égaux à 3 permettent de caractériser d'autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B, tout en excluant formellement le diagnostic de la LLC (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997).

Antigène	Attribuer 1 point si	Attribuer 0 point si
CD 5	Positif	Négatif
CD 23	Positif	Négatif
CD 22/ CD 79b	Faiblement exprimé ou négatif	Fortement exprimé
FMC7	Négatif	Positif
Ig de surface monotypique	Faiblement exprimée	Fortement exprimée

Tableau 1 : Score de Matutes  
D'après Evrard et al., 2005

### I.5. Les facteurs pronostiques

Selon les patients, la LLC peut présenter une évolution extrêmement variable, allant d'une espérance de vie non modifiée à un décès rapide des suites de la pathologie elle-même ou de ses complications. La découverte de facteurs pronostiques a ainsi été d'une importance capitale pour classer les patients en différents groupes prédictifs de l'évolution de la

maladie mais permettant surtout de déterminer une stratégie thérapeutique adaptée, de plus en plus ciblée au cours des dernières années.

Des facteurs non spécifiques à la LLC, peuvent impacter négativement la survie de patients. On trouve parmi ces facteurs l'âge avancé, un mauvais état général du patient, le sexe masculin ou encore la présence de signes de comorbidités associées à la LLC (Bossard et al., 2007; Catovsky et al., 1989; Lee et al., 1987).

### **I.5.1. Les classifications cliniques**

Les systèmes de classification de Rai et de Binet permettent de classer les LLC en groupes pronostiques en s'appuyant sur des paramètres cliniques.

#### **I.5.1.1. La classification de Rai**

La classification de Rai, établie en 1975 (Rai et al., 1975), définit cinq groupes basés sur la survie médiane la plus courte. Les groupes sont définis par l'existence d'un syndrome tumoral (adénopathie, splénomégalie ou hépatomégalie) et la présence de cytopénies (anémie, thrombopénie) (Tableau 2). Par la suite, la classification de Rai a été modifiée (Hallek, 2017; Scarfò et al., 2016), pour réduire à 3 le nombre de catégories de risque (Tableau 3). Les patients présentant une lymphocytose isolée dans le sang et/ou la moelle osseuse (cellules lymphoïdes >30%) sont considérés comme à faible risque (anciennement stade Rai 0). Les patients avec lymphocytose, adénopathies et splénomégalies, associées ou non à une hépatomégalie, présentent une pathologie à risque intermédiaire (anciennement stade Rai I ou Rai II). Les patients atteints d'une lymphocytose associée à une anémie (taux d'hémoglobine <11 g/dL) ou à une thrombocytopenie (nombre de plaquette < 100000/mm<sup>3</sup>) sont considérés comme à risque élevé (anciennement stade Rai III et Rai IV respectivement) (Hallek, 2017).

Stade	Définition	Survie médiane (mois)
Stade 0	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L)	> 150
Stade I	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + adénopathies	100
Stade II	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) avec ou sans adénopathies + hépatomégalie ou splénomégalie	70
Stade III	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + anémie (Hb < 10 g/dL) +/- stade I et II	19
Stade IV	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + thrombopénie (< 100 G/L) +/- stade I, II ou III	17

Tableau 2 : Classification de Rai version originale  
D'après Evrard et al., 2005; Rai et al., 1975

Risque	Définition
<i>Faible</i>	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée >5000/mm <sup>3</sup> (Stade 0)
<i>Intermédiaire</i>	Lymphocytose avec adénopathies (Stade I) et/ou hépato- splénomégalie (Stade II)
<i>Élevé</i>	Lymphocytose avec anémie (Stade III) et/ou thrombocytopenie (Stade IV)

Tableau 3 : Classification de Rai révisée  
D'après Scarfò et al., 2016

### I.5.1.2. La classification de Binet

La classification de Binet (Binet et al., 1981), datant de 1981, définit trois stades pronostiques, stades A, B, et C, d'après les valeurs de l'hémogramme ainsi que le nombre d'aires ganglionnaires atteintes au moment de l'examen physique. Cette classification est prédictive de la survie des patients, avec une médiane supérieure à 12 ans pour les stades A, puis de 5 à 8 ans pour les stades B et moins de 5 ans pour les stades C (Tableau 4).

Stade	Définition	Survie médiane
<b>Stade A</b> bon pronostic	Lymphocytose, moins de 3 aires ganglionnaires atteintes, Hb > 10 g/dL et plaquettes > 100 G/L	Comparable à la population du même âge
<b>Stade B</b> pronostic intermédiaire	Lymphocytose, plus de 3 aires ganglionnaires atteintes, Hb > 10 g/dL et plaquettes > 100 G/L	7 ans
<b>Stade C</b> mauvais pronostic	Lymphocytose, Hb < 10 g/dL et/ou plaquettes < 100 G/L, quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes	2 ans

Tableau 4 : Classification de Binet

Extrait de Evrard et al., 2005

Les deux classifications de Rai et de Binet permettent donc de classer les patients LLC selon 3 groupes : les stades précoces, Rai 0 et Binet A, avec une moyenne de survie supérieure à 10 ans, les stades intermédiaires, Rai I/II et Binet B, avec une moyenne de survie de 5 à 7 ans, et les stades avancés, Rai III/IV et Binet C, avec une moyenne de survie de 2 à 4 ans (Figure 7) (Binet et al., 1981; Montserrat, 2006; Rai et al., 1975). Malgré leurs bonnes valeurs pronostiques, les classifications de Rai et Binet ne prennent en compte que les caractéristiques cliniques de la pathologie. En effet ces deux systèmes ne permettent pas de différencier des patients en stade précoce avec un bon pronostic (pathologie stable et peu d'évolution) d'un patient à mauvais pronostic (évolution en stades intermédiaires puis avancés, avec nécessité plus rapide d'un traitement). L'identification de nombreux facteurs pronostiques, biologiques et moléculaires, ont permis d'améliorer les prédictions d'évolution de la maladie, de survie du patient, mais également de réponse aux traitements (Cramer and Hallek, 2011; Kay et al., 2007).



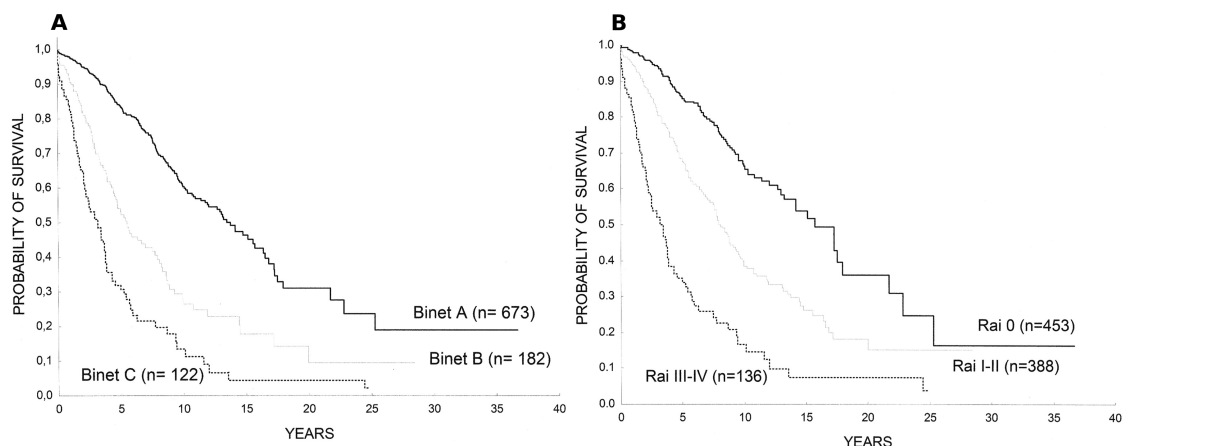


Figure 7 : Survie globale des patients atteints de LLC selon les classifications de Binet (A) et de Rai (B)

Extrait de Montserrat, 2006

### I.5.1.3. Le temps de doublement lymphocytaire

Le temps de doublement lymphocytaire est la durée au cours de laquelle le nombre absolu de lymphocytes B observé au diagnostic est doublé. Un temps de doublement lymphocytaire inférieur à un an est associé à un pronostic défavorable, avec une survie sans progression réduite ainsi qu'une survie globale diminuée. S'il est inférieur à 6 mois, la maladie est alors considérée comme à progression rapide et nécessite un traitement immédiat. Cet outil n'est cependant fiable que pour évaluer l'activité de la maladie de patients en stade précoce ( $<30000$  LB/mm<sup>3</sup>) (Cramer and Hallek, 2011).

### I.5.2. Le statut mutationnel *IgHV*

Le statut mutationnel des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobuline *IGHV* permet de séparer les patients LLC en deux groupes distincts. Ce statut mutationnel dépend de l'origine des cellules B, en effet, les cellules B naïves (ou pré-germinales) possèdent des gènes *IGHV* non mutés, tandis que ceux des cellules B mémoires (post-germinales) sont mutés (Chiorazzi et al., 2005). Un gène *IGHV* est considéré comme muté si plus de 2% de la séquence ADN (acide désoxyribonucléique) est non-homologue à celle des LB naïfs (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 2002). Environ 60% des patients sont *IGHV* mutés, et 40% non mutés ; contrairement à de nombreux autres facteurs, le statut mutationnel *IGHV* d'un individu reste le même tout au long de la maladie (Hamblin et al., 2002; Kröber et al., 2002).

Le statut mutationnel *IGHV* est l'un des premiers marqueurs biologiques à valeur prédictive sur le pronostic clinique à avoir été identifié. Les patients avec des gènes *IGHV*

non-mutés ont significativement plus de chances d'être plus âgés, de présenter des stades avancés de la maladie, des morphologies cellulaires atypiques, et une maladie progressive (Hamblin et al., 1999). Les gènes *IGHV* non-mutés sont donc associés avec des pathologies de stades plus avancés, prédisant une survie sans progression de la maladie et une survie globale des patients diminuées, et ce quel que soit le stade de la maladie (Figure 8) (Kröber et al., 2002; Stilgenbauer et al., 2007). L'identification de clones *IGHV* non-mutés est donc de mauvais pronostic pour le patient (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 2002). Une étude récente a montré que plus le taux de mutations est élevé plus le pronostic de survie sans progression et de survie globale est favorable, suggérant qu'un classement des patients selon le pourcentage de mutation des gènes *IGHV* serait plus relevant qu'une séparation muté/non-muté (Figure 8) (Jain et al., 2018).

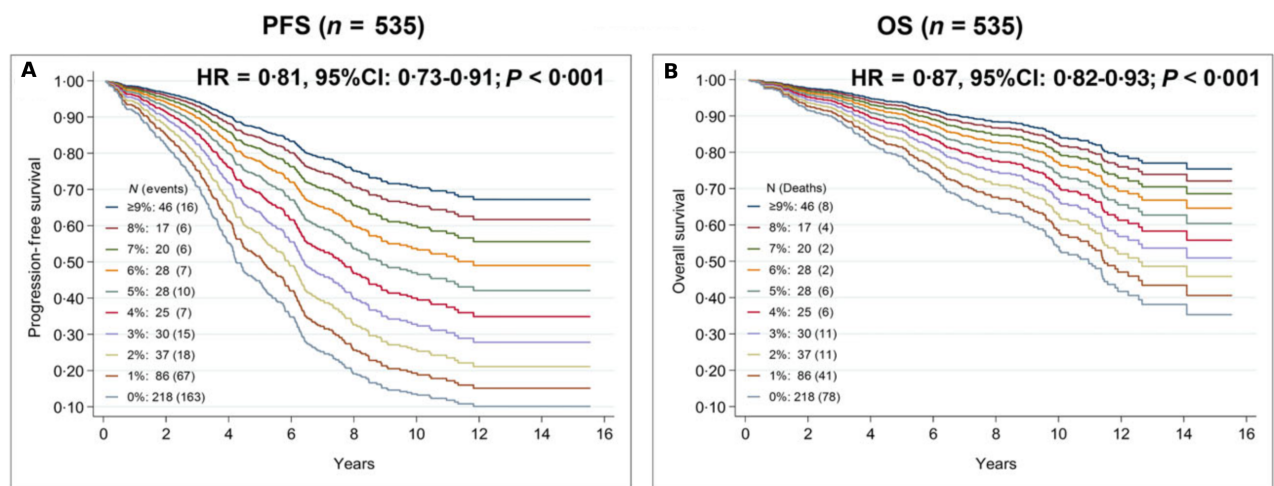


Figure 8 : Courbe de survie sans progression (A) et survie globale (B) selon le pourcentage de mutation *IGHV* (de 0% à 9% et plus)

Extrait de Jain et al., 2018

### 1.5.3. L'expression de CD38

La protéine CD38 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface des lymphocytes B, où elle joue un rôle important dans les processus apoptotiques. Elle stimule la survie et la prolifération des LB suite à leur transformation néoplasique (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 2002; Malavasi et al., 2011). Une forte expression de CD38 dans les cellules leucémiques est de mauvais pronostic, associée à des stades avancés de la LLC, des survies sans progression et globale diminuées et un temps plus court avant l'initiation du premier traitement (D'arena et al., 2001; Del Poeta et al., 2013; Dürig et al., 2002). L'expression de CD38 est fortement associée au le statut mutationnel *IGHV*, en effet les patients avec des

gènes *IGHV* non-mutés ont une expression de CD38 significativement plus importante (Damle et al., 1999). Ainsi, le niveau d'expression de CD38 pourrait servir de marqueur pour remplacer le statut mutationnel *IGHV*, cependant contrairement à ce dernier, l'expression de CD38 peut varier au cours de l'évolution de la LLC, c'est donc un très bon marqueur pronostique, mais dépendant du moment de l'analyse (Ghia et al., 2003; Ibrahim et al., 2001).

#### **I.5.4. L'expression de ZAP-70**

La protéine ZAP-70 est une protéine tyrosine kinase cytoplasmique impliquée dans la signalisation du TCR. L'expression de ZAP-70 est détectée dans les LB-LLC mais pas dans les LB normaux (Chen et al., 2002). L'expression de ZAP-70 est le facteur le plus discriminatoire entre les statuts *IGHV* mutés ou non-mutés et permet de prédire dans 93% des cas le statut mutationnel (Wiestner et al., 2003). Contrairement à CD38, le niveau d'expression de ZAP-70 ne varie pas au cours de la maladie (Crespo et al., 2003) et une forte expression est de mauvais pronostic, associée à une augmentation de la signalisation du BCR contribuant à une maladie plus agressive (Chen et al., 2002). Un pourcentage supérieur à 20% de cellules ZAP-70<sup>+</sup> est associé à une survie globale diminuée (Crespo et al., 2003; Rassenti et al., 2004). Enfin, le taux d'expression de ZAP-70 semble être le meilleur facteur pronostic, en comparaison à CD38 et au statut mutationnel *IGHV*, pour des patients nouvellement diagnostiqués, même pour les patients présentant des stades asymptomatiques ou précoces de LLC (Rassenti et al., 2008).

Les niveaux d'expression de CD38 et de ZAP-70, au même titre que le statut mutationnel *IGHV*, semblent donc être de bons marqueurs pronostiques, avec l'avantage de pouvoir être analysés rapidement et en routine par cytométrie en flux.

L'association des trois facteurs reste le meilleur facteur prédictif. Ainsi une LLC CD38<sup>-</sup>/ZAP-70<sup>-</sup>/*IGHV*<sup>muté</sup> correspondrait au groupe ayant le meilleur pronostic et une LLC CD38<sup>+</sup>/ZAP-70<sup>+</sup>/*IGHV*<sup>non-muté</sup> au groupe ayant le moins bon pronostic (Figure 9) (Morilla et al., 2008; Rassenti et al., 2008).

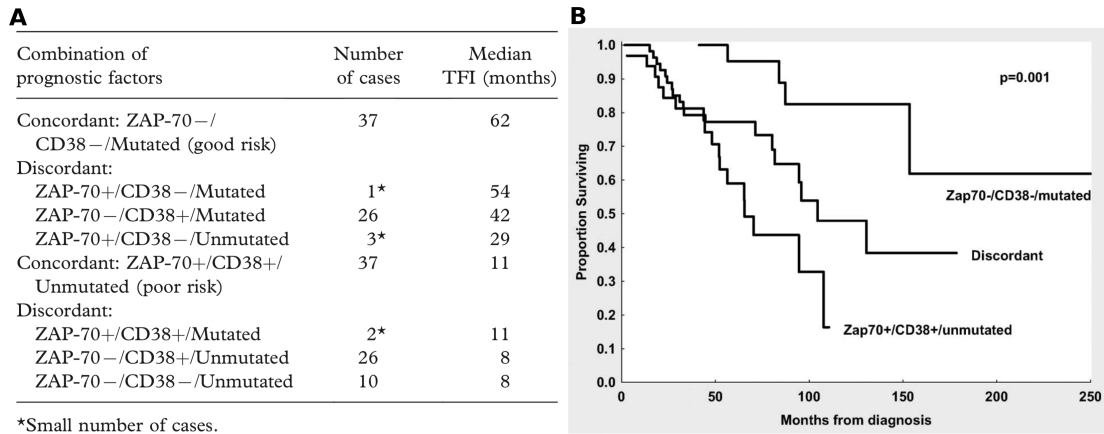


Figure 9 : Les facteurs pronostiques CD38, ZAP-70 et mutation de *IGHV*

A) Impact des combinaisons des trois facteurs CD38, ZAP-70 et mutation de *IGHV* sur le délai d'initiation du premier traitement après le diagnostic. B) Courbe de survie globale des patients LLC selon le groupe de combinaison des trois facteurs précédents.

Extrait de Morilla et al., 2008

### I.5.5. Les facteurs sériques

L'avantage d'utiliser des marqueurs sériques en tant que facteurs de diagnostic et de pronostic est la simplicité, la rapidité et la fiabilité des résultats. Trois facteurs solubles ont été identifiés comme marqueurs de la LLC, la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2-m), la Thymidine Kinase (TK) et le CD23 soluble, mais leur utilisation en clinique reste limitée en raison de la forte influence de facteurs non reliés à la LLC sur leurs taux sériques (Cramer and Hallek, 2011)

#### I.5.5.1. La $\beta$ 2 microglobuline

La  $\beta$ 2-m est une protéine extracellulaire appartenant au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I, pouvant se trouver sous forme soluble dans le sérum. La concentration de la forme sérique de la  $\beta$ 2-m est considérée comme un marqueur pronostique dans la LLC (Hallek et al., 1999). La présence d'une concentration élevée de  $\beta$ 2-m dans le sérum est associée à un stade avancé de la maladie, une masse tumorale élevée, ainsi qu'une invasion médullaire et ganglionnaire, et est de mauvais pronostic avec une survie sans traitement plus courte et une réponse diminuée aux chimiothérapies (Delgado et al., 2009; Gentile et al., 2009; Montillo et al., 2005). Il existe également une corrélation entre le taux de  $\beta$ 2-m et l'expression de CD38 et ZAP-70 (Schroers et al., 2005). La valeur pronostique de la  $\beta$ 2-m est donc bonne et elle peut être analysée en routine, mais doit

cependant être ajustée par rapport à son élimination rénale dépendante du débit de filtration glomérulaire (Cramer and Hallek, 2011).

### **I.5.5.2. La Thymidine Kinase**

La TK est une enzyme impliquée dans le contrôle de la synthèse d'ADN, elle est donc exprimée en quantité plus importante dans les cellules en prolifération. Dans la LLC, un taux sérique élevé de TK est corrélé avec des stades avancés de la maladie, une progression rapide, et une mauvaise réponse aux traitements, et donc de mauvais pronostic (Cramer and Hallek, 2011; Di Raimondo et al., 2001). Des taux élevés de TK sérique sont également associés à d'autres facteurs de mauvais pronostic tels que le temps de doublement lymphocytaire, l'expression de CD38 et ZAP-70, les taux de CD23 solubles, les anomalies cytogénétiques et le statut mutationnel *IGHV* (Matthews et al., 2006). Les taux de TK élevés ne sont cependant pas spécifiques de la LLC et son utilisation comme facteur pronostique est donc limitée.

### **I.5.5.3. Le CD23 soluble**

Le CD23 est un récepteur de faible affinité pour les IgE exprimé à la surface des LB matures et des LB leucémiques. Sa forme soluble agit comme un facteur de croissance induisant la prolifération des LB normaux et leucémiques (Molica et al., 1996; Sarfati et al., 1996). Sa forte expression sérique dans la LLC est associée aux infiltrations médullaires, à une masse tumorale importante et un temps de doublement lymphocytaire plus court. Le CD23 soluble est donc un facteur de mauvais pronostic, associé à une progression de la pathologie aux stades précoces et une survie globale réduite (Cramer and Hallek, 2011) et son dosage pourrait permettre un diagnostic plus précoce de la LLC (Kaaks et al., 2015).

### **I.5.6. Les anomalies cytogénétiques**

Des anomalies cytogénétiques récurrentes sont observées dans la LLC au niveau des régions chromosomiques 13q, 11p, 12q, 17p et 6q. La détection standard de ces anomalies cytogénétiques est réalisée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et permet d'identifier au moins une anomalie dans plus de 80% des cas de LLC (Döhner et al., 2000; Nelson et al., 2007). Les patients peuvent présenter une seule ou plusieurs anomalies associées, certaines d'entre elles ont une valeur pronostique, la délétion 13q associée à une survie plus longue tandis que les délétions 11q et 17p sont associées à des survies plus courtes, et sont prises en compte dans les choix thérapeutiques. Les anomalies cytogénétiques peuvent apparaître au cours du développement de la LLC, et surviennent plus fréquemment

chez les patients *IGHV* non-muté (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 2002). Un système hiérarchique a été établi, définissant cinq groupes, classés du meilleur au moins bon pronostic : la délétion 13q14, aucune anomalie, la trisomie 12, la délétion 11q22-23 et la délétion 17p13 (Döhner et al., 2000).

#### **I.5.6.1. La délétion 13q14**

La délétion 13q14 est l'anomalie génétique la plus commune dans les cas de LLC, elle est observée chez environ 55% des patients, et est associée à un pronostic favorable, avec une médiane de survie de 133 mois (Döhner et al., 2000). Elle correspond à une délétion cryptique de la bande 13q14.3, le plus souvent hétérozygote mais également parfois de façon homozygote sans différences cliniques notables (Garg et al., 2012; Puiggros et al., 2013). Au niveau de cette région 13q se situent les gènes codant les miR-15a et miR-16-1, inhibiteurs de Bcl-2, et connus pour être impliqués dans la leucémogénèse (Calin et al., 2002). Cette délétion est associée à un bon pronostic, supérieur à celui des patients sans anomalie cytogénétique, qui peut s'expliquer par la proximité dans la même région d'un cluster régulant la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Klein et al., 2010).

#### **I.5.6.2. La trisomie 12**

La trisomie 12 est la première anomalie cytogénétique observée dans les cas de LLC, elle est détectée chez 10 à 20% des patients et est associée à un pronostic intermédiaire avec une médiane de survie de 114 mois (Döhner et al., 2000; Nguyen-Khac et al., 2013). Elle apparaît précocement dans le développement de la maladie et joue un rôle dans l'acquisition d'anomalies supplémentaires, telles que la trisomie 19 ou des mutations de *NOTCH1* et *TP53* (Falisi et al., 2014; Landau et al., 2013; Sellmann et al., 2007). Les facteurs de risques ZAP-70<sup>+</sup>, les mutations de *NOTCH1*, et un statut *IGHV* non-muté sont associés avec la trisomie 12 (Balatti et al., 2012; Quijano et al., 2008).

#### **I.5.6.3. La délétion 11q22-23**

Cette délétion est la deuxième anomalie cytogénétique la plus fréquente, elle est détectée dans 5 à 20% des cas, généralement présentant à une atteinte ganglionnaire importante et des gènes *IGHV* non-mutés (Döhner et al., 2000; Marasca et al., 2013; Wierda et al., 2011; Zenz et al., 2010a). La région délétée contient les gènes *ATM* (gène suppresseur de tumeur, le second allèle est également é muté dans 22 à 40% des cas) et *BIRC3* (inhibiteur de NF-κB) ce qui pourrait contribuer au développement de la pathologie et à son mauvais

pronostic (Rose-Zerilli et al., 2014; Rossi et al., 2012a). La délétion 11q est associée à un délai d'initiation du premier traitement plus court, une rémission moins durable et une survie globale diminuée (Döhner et al., 1997, 2000; Rossi et al., 2015).

#### **I.5.6.4. La délétion 17p13**

Les délétions 17p13 sont détectées dans 3 à 10% des cas et sont historiquement liées à une moins bonne réponse thérapeutique des patients, une survie sans progression diminuée, de même que la survie globale (Stilgenbauer et al., 2009). Cette délétion entraîne la perte du gène *TP53* et est ainsi de très mauvais pronostic. La délétion 17p13 est en règle générale également associée à d'autres facteurs de mauvais pronostics, l'expression de CD38 et ZAP-70 et des gènes *IGHV* non-mutés (Kröber et al., 2006; Quijano et al., 2008). Les délétions acquises au cours de l'évolution de la maladie, et non en tant qu'évènement primaire, sont de pronostic très péjoratif (Landau et al., 2013), et les patients ayant cette délétion représentent près de la moitié des cas résistant au traitement à la fludarabine (Wawrzyniak et al., 2014). Dans plus de 90% des cas de LLC avec délétion 17p13, l'autre copie du gène *TP53* est mutée (Malcikova et al., 2009).

#### **I.5.6.5. Le gain 2p**

Cette anomalie correspond au gain d'une partie ou de tout le bras court du chromosome 2. Elle est observée dans 28% des cas de LLC en stade binet B/C (Chapiro et al., 2010). Cette anomalie entraîne une dérégulation des gènes présents dans cette région, notamment *REL* (2p16.1), *ACPI* (2p25.3), *XPO1* (2p15) et les oncogènes *NCOA1* (2p23.3), *ROCK2* (2p25.1), *ALK* (2p22.3) et *MYCN* (2p24.3) (Cosson et al., 2017; Fabris et al., 2013; Ma et al., 2011). La protéine REL joue un rôle dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, ACPI (*Acid Phosphatase 1*) dans la signalisation des lymphocytes T (LT) et l'exportin-1 est impliquée dans la régulation de la voie des MAPKs et régule les facteurs de transcription NFAT et AP-1 (*Activating Protein 1*). ROCK2 (*Rho-associated protein kinase 2*) et NCOA1 (*Nuclear Receptor Coactivator 1*) sont impliquées dans l'activation de voies de signalisation, respectivement la voie des MAPKs et les facteurs de transcriptions STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et STAT5. ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*) joue un rôle dans la signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase, tandis que Myc-N est un facteur de transcription surexprimé dans de nombreux cancers. Au voisinage chromosomique des gènes codants ces protéines se trouve le gène *NTSR2*, en 2p25.1 (Figure 10). Ce gène est donc potentiellement dérégulé en même temps que ceux décrits précédemment.

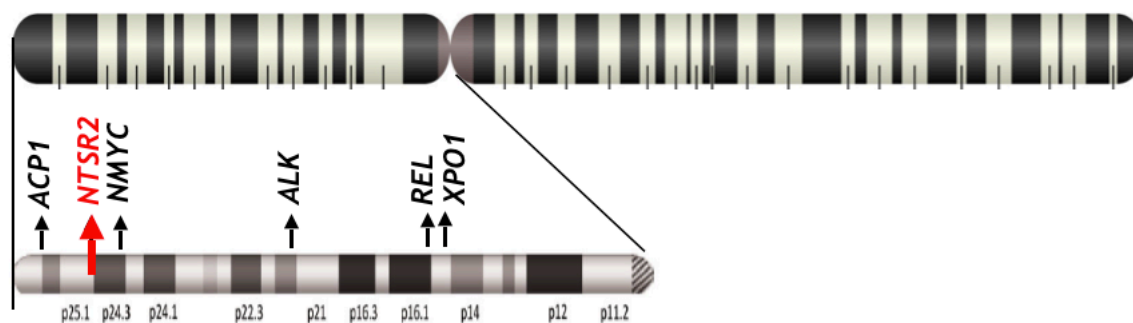


Figure 10 : Représentation du bras 2p du chromosome 2 et localisation des gènes dérégulés lors du gain 2p ainsi que du gène *NTSR2*.

Le gain 2p est associé au statut *IGHV* non-muté et aux expressions de CD38 et ZAP70. De même le gain 2p est dans la grande majorité des cas associé avec d'autres anomalies cytogénétiques, telles que del13q14, del11q22, del17p13 ou del6p (Chapiro et al., 2010). Le gain 2p est donc associé à un mauvais pronostic. De plus une étude a directement impliqué le gène *XPO1*, dérégulé lors du gain 2p, dans les mécanismes de résistance aux thérapies actuelles telles que l'ibrutinib, le venetoclax ou l'idelalisib, conférant une valeur pronostique au gain 2p quant aux réponses des patients aux traitements (Cosson et al., 2017).

#### I.5.6.6. Le caryotype complexe

Un caryotype complexe correspond à un caryotype possédant 3 anomalies cytogénétiques ou plus. Les caryotypes complexes sont observés jusqu'à 16% des cas (à la fois non-traités et en rechute après chimiothérapie). Il est souvent associé avec les facteurs de mauvais pronostics CD38, *IGHV* non-muté, délétions 11q et 17p (Haferlach et al., 2007; Jaglowski et al., 2012) et est donc de mauvais pronostic, avec une diminution de la survie sans progression et de la survie globale (Neste et al., 2007; Woyach et al., 2012b). C'est également la seule anomalie cytogénétique qui prédit une résistance aux traitements à l'ibrutinib (Thompson et al., 2015).

#### I.5.6.7. Autres anomalies cytogénétiques

Certains cas de LLC peuvent présenter des anomalies cytogénétique moins fréquentes. Parmi elles la délétion 6q21-23, présente chez 5-6% des patients (Zhang et al., 2000), est associée à une hyperlymphocytose importante, des LB à morphologie atypiques et un pronostic intermédiaire. Dans d'autres cas (4 à 7%), sont détectées des translocations chromosomiques impliquant le réarrangement des gènes *IGHV* en localisation 14q32. Ce



locus peut être juxtaposé au locus *BCL1* en 11q13, ce qui entraîne l'activation constitutive du gène codant la cycline D1 et donc une stimulation du cycle cellulaire (Harris et al., 1999). Il peut aussi être juxtaposé au locus 18q21, entraînant une surexpression du gène *BCL2*. D'autres translocations, ont été observées t(14;19)(q32;q13) impliquant le gène *BCL3* (Chapiro et al., 2008), ou encore t(2;14)(p13;q34) impliquant les gènes *IGHV* et *BCL11A* (Satterwhite et al., 2001). Ces translocations sont toutes rares et associées à un mauvais pronostic.

<i>Anomalies</i>	<i>Fréquence (%)</i>	<i>Gènes associés</i>	<i>Processus cellulaires affecté</i>	<i>Pronostique</i>
<i>del(13q14)</i>	50	<i>MIR15A/MIR16-1, DLEU2, RB1, DLEU7</i>	Régulation de l'expression de Bcl-2, contrôle du cycle cellulaire, signalisation NF-kB	Bon
<i>Trisomie 12</i>	20	<i>Inconnu</i>	Inconnu	Bon/Intermédiaire
<i>del(11q22-23)</i>	6-20	<i>ATM, BIRC3</i>	Réparation de l'ADN, signalisation NF-kB	Mauvais
<i>del(17p13)</i>	5-10	<i>TP53</i>	Perte d'un suppresseur de tumeurs	Mauvais
<i>del(6q21)</i>	5-7	<i>ZNF292</i>	Régulation transcriptionnelle	Inconnu
<i>Gain 2p</i>	5-28	<i>XPO1, REL, BCL11A, MYCN</i>	Mécanismes d'épissage de l'ARN, signalisation NF-kB, prolifération	Mauvais
<i>amp(8q24.21)</i>	5	<i>MYC</i>	Prolifération, apoptose	Mauvais
<i>del(8p)</i>	5	<i>TRAIL-R</i>	Apoptose	Mauvais
<i>del(15q15.1)</i>	4	<i>MGA</i>	Régulation transcriptionnelle	Aucun
<i>del(2q37)</i>	2	<i>SPI40/SPI10</i>	Régulation transcriptionnelle	Aucun
<i>del(3p21)</i>	2	<i>SMARCC1/SETD2</i>	Épissage de l'ARN et réparation de l'ADN	Mauvais

<i>del(10q24)</i>	2	<i>NFKB2</i>	Signalisation NF-kB	Inconnu
-------------------	---	--------------	---------------------	---------

Tableau 5 : Résumé des anomalies cytogénétiques fréquentes dans les cas de LLC et leurs effets biologiques et pronostiques associés.

Extrait de (Ghamlouch et al., 2017)

### **I.5.7. Les mutations récurrentes**

L'identification de nouvelles mutations somatiques a permis d'élargir nos connaissances sur l'hétérogénéité génomique des cas de LLC, tout en apportant une plus-value pronostique.

#### **I.5.7.1. Mutation de *TP53***

Le gène *TP53*, est un gène suppresseur de tumeur, situé au niveau de la région 17p13.1. Il code la protéine p53 qui a pour rôle d'induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose de la cellule si elle détecte des dommages au niveau de l'ADN. Si le gène *TP53* est altéré, les cellules présentant des dommages ADN peuvent tout de même poursuivre leur cycle cellulaire et échapper à l'apoptose.

Comme discuté précédemment, le gène *TP53* peut être délété lors des délétions 17p13 dans certains cas de LLC, mais des mutations de ce gène sont également détectées. Ces mutations prédisent une forte diminution de la survie globale des patients ainsi qu'une résistance aux traitements (The International CLL-IPI working group, 2016). Une étude de 309 patients a montré que 14% des patients ont des anomalies de *TP53*, et parmi eux 22% portaient uniquement la mutation de *TP53* sans la délétion 17p13 (Rossi et al., 2009b). Ces patients ayant uniquement une mutation ont un pronostic aussi défavorable que ceux possédant une délétion 17p13, et les patients présentant une délétion sur un allèle et une mutation sur l'autre ont encore un moins bon pronostic (Gonzalez et al., 2011; Zenz et al., 2010b).

#### **I.5.7.2. Mutation de *NOTCH1***

*NOTCH1*, un gène situé au niveau de la région 9q, code pour une protéine transmembranaire de classe I qui agit comme un facteur de transcription activé par son ligand, et qui est impliquée dans la régulation de la différenciation, la prolifération et l'apoptose, notamment lors du développement du système hématopoïétique (Suresh and Irvine, 2015). Des mutations de *NOTCH1* sont observées chez environ 4% des patients au diagnostic, mais chez 30% des patients dans les cas de LLC en rechute ou réfractaires aux traitements (Fabbri

et al., 2011; Rossi et al., 2012b). Les mutations de *NOTCH1* sont considérées comme de mauvais pronostic, avec une diminution des survies globales et des réponses aux chimiothérapies et chimio-immunothérapies (Bo et al., 2014). Près d'un tiers des patients avec une trisomie 12 présentent des mutations de *NOTCH1* créant ainsi une sous-catégorie avec un moins bon pronostic (Oscier et al., 2013).

#### **I.5.7.3. Mutation de *SF3B1***

Le gène *SF3B1* est situé au niveau de la région 2q33.1 et code pour la protéine *Splicing Factor 3B Subunit 1*, impliquée dans la formation du complexe d'ubiquitination U2 nécessaire aux mécanismes d'épissage des ARN (acide ribonucléique) messagers. Des mutations de *SF3B1* sont observées chez 9 à 15% des patients, ce qui en fait la deuxième mutation la plus fréquente après *TP53*, et qui est détectée principalement chez des patients ayant la délétion 11q22-23 (Wang et al., 2011b). Les mutations de *SF3B1* et de *NOTCH1* sont mutuellement exclusives (Nabhan et al., 2015). Les mutations de *SF3B1* sont associées à un mauvais pronostic, avec des réponses diminuées aux chimio-immunothérapies et des périodes de rémission plus courtes (Hallek et al., 2010; Rossi et al., 2011; Stilgenbauer et al., 2014).

#### **I.5.7.4. Mutation de *MYD88***

Le gène *MYD88* se situe à la localisation 3p21.3-3p22 et code une protéine cytoplasmique ayant un important rôle de médiateur de la réponse immunitaire (Bonnert et al., 1997). Des mutations de *MyD88* sont présentes chez environ 5% des patients atteints de LLC, souvent en association avec des *IGHV* mutés et de faibles expressions de CD38 et ZAP-70. De plus les patients mutés *MyD88* sont généralement jeunes (médiane de 47 ans), l'ensemble de ces facteurs tend donc vers un pronostic favorable des mutations *MyD88*. Les délais avant le traitement initial et la survie globale ne sont cependant pas différents des patients sans mutation (Baliakas et al., 2015; Martínez-Trillos et al., 2014).

#### **I.5.7.5. Mutation de *ATM***

Le gène *ATM*, localisé en 11q22-q23, code une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Campregher and Hamerschlak, 2014). On détecte des mutations chez jusqu'à 25% des patients, associées ou non aux délétions 11q décrites précédemment (Austen et al., 2005). 30 à 40% des patients présentant une délétion 11q portent une mutation sur le deuxième allèle de *ATM* tandis que 22 à 75% des patients mutés ont également une délétion 11q (Austen et al., 2007; Guarini et al., 2012). Les

mutations de *ATM* sont de mauvais pronostic, souvent associées aux *IGHV* non-muté et à l'expression de ZAP-70, et le pronostic est encore dégradé lorsque les mutations *ATM* sont associées à une délétion 11q (Rossi and Gaidano, 2012).

#### 1.5.7.6. Mutation de *BIRC3*

*BIRC3* est un régulateur négatif de la signalisation NF- $\kappa$ B et est muté dans 4 à 9% des cas de LLC (Chiaretti et al., 2014; Rossi et al., 2012a). Le gène *BIRC3* se situe dans le voisinage chromosomique de *ATM* sur le bras 11q et est sa délétion occure dans 83% des cas dans lesquels *ATM* est délété. La perte de *BIRC3* par mutation ou délétion provoquerait une activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B, et est associée à un mauvais pronostic, avec une augmentation de la résistance aux chimiothérapies à base de fludarabine et diminution de la survie globale (Rossi et al., 2012a, 2013).

#### 1.5.8. L'index de pronostic international pour les patients atteints de LLC (IPI-CLL)

Une classification internationale, l'IPI-CLL, a été proposé en 2016 (*International CLL-IPI working group*, 2016). En prenant en compte les facteurs pronostiques principaux, ainsi que les stades cliniques de la LLC présentés par les patients, un score est assigné selon un modèle multivarié (Tableau 6), et les scores obtenus déterminent quatre groupes de risque. Un score de 0 ou 1 est associé à un risque faible, un score de 2 ou 3 correspond à un risque intermédiaire, un score de 4 à 6, à un risque élevé, et un score de 7 à 10 définit le groupe à très haut risque. Plus le risque est élevé, plus la survie globale des patients est diminuée ; cette classification a été appliquée à 4 cohortes indépendantes de patients, montrant des résultats similaires, ce qui semble valider cette méthode (Figure 11).

<i>Marqueur pronostique</i>	<i>Facteur de risque</i>	<i>Score de risque assigné</i>
<i>Statut du gène TP53</i>	Délétion ou mutation	4
<i>Statut mutationnel IGHV</i>	Non-muté	2
<i>Concentration sérique de <math>\beta</math>2-microglobuline</i>	>3-5 mg/L	2
<i>Stade clinique</i>	Rai I-IV ou Binet B-C	1
<i>Age</i>	>65 ans	1

Tableau 6 : Modèle multivarié CLL-IPI.

D'après International CLL-IPI working group, 2016

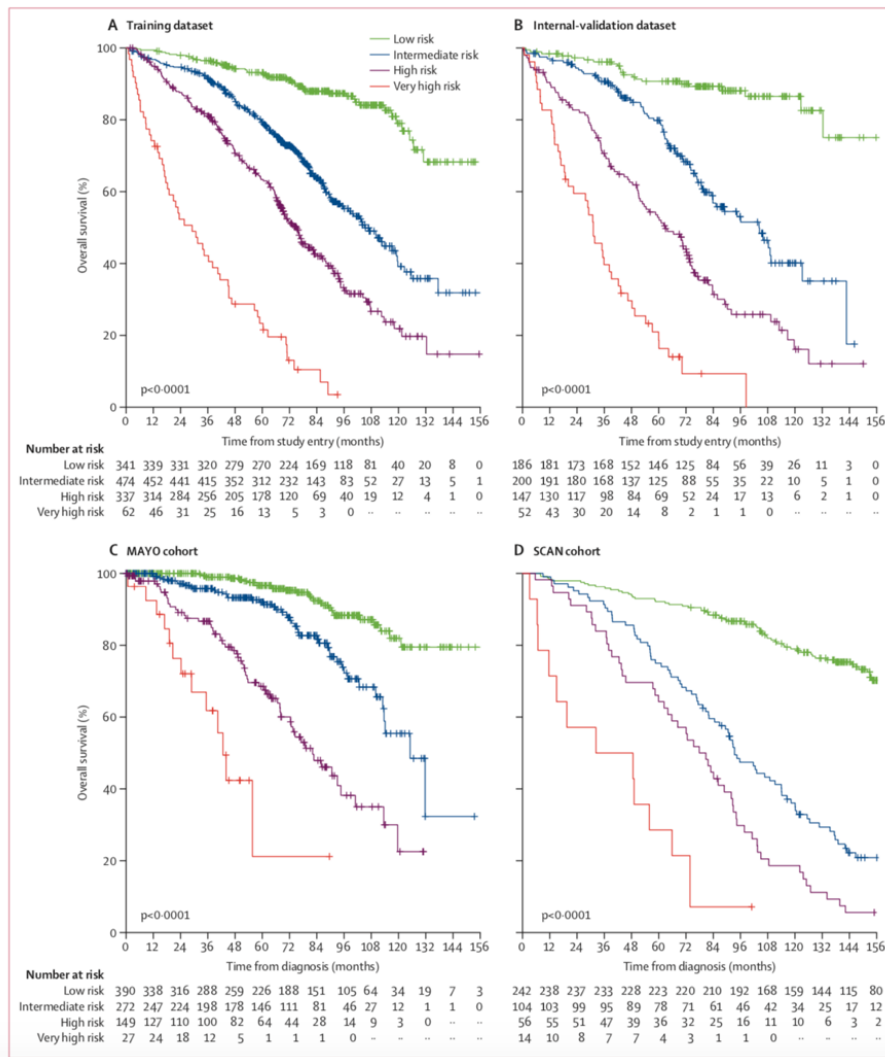


Figure 11 : Survie globale selon le groupe de risque CLL-IPI.

Extrait de *International CLL-IPI working group*, 2016.

## I.6. L'évolution de la maladie

La LLC est dans la majorité des cas une maladie indolente durant de nombreuses années avec une évolution lente et progressive. L'évolution est cependant très hétérogène selon les patients, certains présentant une évolution extrêmement rapide et fatale de la masse tumorale. Des complications associées à la pathologie viennent également s'ajouter à cette hétérogénéité.

Les complications infectieuses sont les plus fréquentes. Les patients atteints de LLC sont généralement victime d'une immunodépression secondaire (hypogammaglobulinémie, neutropénie, défaut d'opsonisation, LT dysfonctionnels) créant ainsi un risque d'infection majeur. On observe des infections bactériennes à germes encapsulés, les plus fréquentes, ainsi que des infections fongiques et herpétiques qui peuvent augmenter selon les traitements ;

la combinaison de Fludarabine, Cyclophosphamide et Rituximab est connue pour créer un risque majeur d'infection bactérienne et de réactivation virale. Les complications infectieuses sont la première cause de morbidité et de mortalité des patients atteints de LLC (Hallek et al., 2008; Molica, 1994; Morrison, 2010; Young, 2011).

La LLC peut également entraîner des complications auto-immunes, les plus fréquentes étant l'anémie hémolytique auto-immune et le purpura thrombopénique immunologique. Des cas d'érythroblastopénie et de granulocytopénie auto-immune, entraînant la destruction des précurseurs myéloïdes et conduisant au développement d'infections, ont aussi été observés (Strati and Caligaris-Cappio, 2011). Il est estimé que 5 à 10% des patients atteints de LLC développent des complications auto-immunes (Zent and Kay, 2010).

L'immunosuppression engendrée par la présence de la LLC pourrait être associée à l'apparition chez les patients de cancers solides qualifiés de secondaires. En effet, les risques sont plus élevés chez les patients LLC que chez les personnes saines, de même âge et de même sexe, de développer ces cancers. On compte parmi eux, des mélanomes, des lymphomes, des cancers de la prostate, du sein, gastro-intestinaux, et pulmonaires (Scarfò et al., 2016).

Dans certains cas relativement rares, la LLC peut se transformer en formes plus agressives, incluant le lymphome diffus ou Syndrome de Richter (SR), la transformation prolymphocytaire, et plus rarement la leucémie aiguë lymphoblastique. La transformation la plus fréquente est le SR, qui survient pour environ 5% des LLC, en moyenne 3,7 ans après le diagnostic, et se caractérise par une fièvre hectique, des adénopathies progressives et une augmentation du taux de lactate déshydrogénase. Le pronostic est très mauvais, avec des options thérapeutiques limitées et peu efficaces et une médiane de survie de 5 à 8 mois (Foon and Gale, 1988; Rossi et al., 2012c; Tsimberidou and Keating, 2005; Tsimberidou et al., 2002).

## **I.7. Les traitements de la LLC**

Au diagnostic, la plupart des patients présentent une pathologie indolente, sans symptômes, avec aucune ou très peu de progression et la pratique courante est de placer ces patients sous surveillance, sans traitement, avec des analyses NFS et des examens physiques réguliers. Une partie non négligeable des patients ne nécessitera jamais de traitement, mais dans la majorité des cas une LLC indolente va évoluer en LLC active, et l'apparition des premiers symptômes constitutifs de la LLC, ou de ses complications, est le signal d'initiation

du traitement (Hallek et al., 2018). L'identification des facteurs pronostiques, cliniques et biologiques, décrits précédemment, permet de sélectionner le traitement le plus approprié pour le patient. Historiquement, le traitement de première ligne recommandé était une combinaison de Fludarabine, Cyclophosphamide et Rituximab (FCR), ou de Bendamustine et Rituximab (BR) qui a prouvé son efficacité pour les patients plus jeunes et pour des LLC à risque bas ou intermédiaire (Eichhorst et al., 2016; Fischer et al., 2011; Hallek et al., 2010; Keating et al., 2005; Thompson and Wierda, 2016). Cependant, les patients à pronostics plus sombres (*IGHV* non muté, *TP53* altéré, patient plus âgé) n'ont des réponses que limitées à ce traitement. Au cours des 5 dernières années, la multitude de traitements disponibles a considérablement augmenté, améliorant substantiellement les perspectives de survie des patients, et notamment des patients les plus à risques. Ces nouveaux agents ont un panel de cibles très variées et permettent une prise en charge de plus en plus personnalisée des patients (Burger and O'Brien, 2018).

### **I.7.1. Les chimio-immunothérapies FCR et BR**

Le traitement le plus classique utilisé en première ligne, le FCR, est l'association de trois agents :

- La Fludarabine, un analogue des nucléosides puriques, qui est incorporé à l'ADN et l'ARN, interférant avec la synthèse et la réparation de l'ADN, résultant en lymphocytopenie (Keating et al., 1998).
- Le Cyclophosphamide, un agent alkylant, induisant des dommages à l'ADN par attachement d'un groupe alkyl sur les guanines de l'ADN
- Le Rituximab, un anticorps anti-CD20, induisant la mort des LB-LLC exprimant le CD20.

Le traitement FCR a révolutionné la thérapie de la LLC (Keating et al., 2005; Wierda et al., 2005), car pour la première fois, 40 à 70% des patients nouvellement diagnostiqués montraient une rémission complète après six cycles de traitement, ainsi qu'un temps de survie sans progression et une survie globale nettement meilleures que celles obtenues avec les anciens traitements (Hallek et al., 2010). Les patients présentant une LLC à faible risque (*del13q*, *IGHV* muté) montrent une rémission durable dépassant régulièrement les 10 ans (Thompson et al., 2016), mais ce traitement a cependant des limites et les patients avec des LLC à haut risque (*del17p*, *del11q*, *IGHV* non-muté) répondent moins bien au traitement (30% de rémission) et la rémission est moins durable (médiane inférieure à 4 ans) (Fischer et al., 2016). Une approche individualisée du traitement consiste à suivre l'efficacité du

traitement, en détectant l'absence de cellules leucémiques résiduelles par cytométrie en flux à partir de prélèvements sanguins, cela permettant d'arrêter le traitement plus tôt en cas de rémission avant la fin des six cycles et ainsi réduire le risque de cancers et complications secondaires chimio-induites (Benjamini et al., 2015; Strati et al., 2014). Le traitement FCR est aujourd'hui le traitement standard utilisé en première ligne pour les patients à faible risque et ne présentant pas de co-morbidités (Cramer et al., 2016).

Le traitement BR, à base de Bendamustine et Rituximab, est l'alternative la plus fréquente au FCR. Les efficacités des deux traitements sont similaires, avec une survie sans progression légèrement plus courte pour le BR. En revanche, le BR entraîne une myélosuppression (neutropénie, thrombocytopénie) moins importante et est donc préconisé pour certains patients (Eichhorst et al., 2016). En cas de non réponse au traitement, celui-ci peut être arrêté et remplacé par l'une des nouvelles thérapies ciblées disponibles (Burger and O'Brien, 2018).

De plus, une étude récente a démontré que l'effet cytotoxique du rituximab serait partiellement dû à l'activation de la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). Une hypersialylation de la membrane plasmique est associée à une résistance des LB-LLC à cette CDC, indépendamment du stade clinique et des facteurs pronostiques. Ainsi, l'expression de l'acide sialique  $\alpha 2-6$  et la résistance à la CDC pourraient constituer un biomarqueur prédictif de résistances aux traitements à base de rituximab (Bordron et al., 2018). Ces patients pourraient alors être orientés vers d'autres thérapies.

### **I.7.2. Les nouvelles thérapies ciblées**

Les inhibiteurs pharmacologiques développés ces dernières années ont pour cible la voie de signalisation du BCR (Figure 12), et plus précisément les kinases impliquées, SYK, BTK et PI3K $\delta$ , ainsi que la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ces inhibiteurs ont été testés pour diverses pathologies malignes B, dégageant trois résultats majeurs. Premièrement, les patients atteints de LLC ont un très bon niveau de réponse à ces agents et des rémissions durables, en comparaison aux autres pathologies testées. Deuxièmement, ces inhibiteurs entraînent tous un phénomène appelé « lymphocytose de redistribution » correspondant à l'augmentation du nombre de LB leucémiques sanguins suite au relargage des LB leucémiques des tissus lymphoïdes secondaires (principalement les ganglions lymphatiques et la rate), associé à une diminution du volume de ces tissus. Enfin, et de façon tout à fait inédite, il n'existe pas de différence d'efficacité de ces inhibiteurs selon le groupe de risque de LLC. Les patients avec



un risque élevé et/ou une résistance aux chimio-immunothérapies classiques montrent une bonne réponse à ces agents, tout en montrant très rarement de signes de myélosuppression (Burger and O'Brien, 2018).

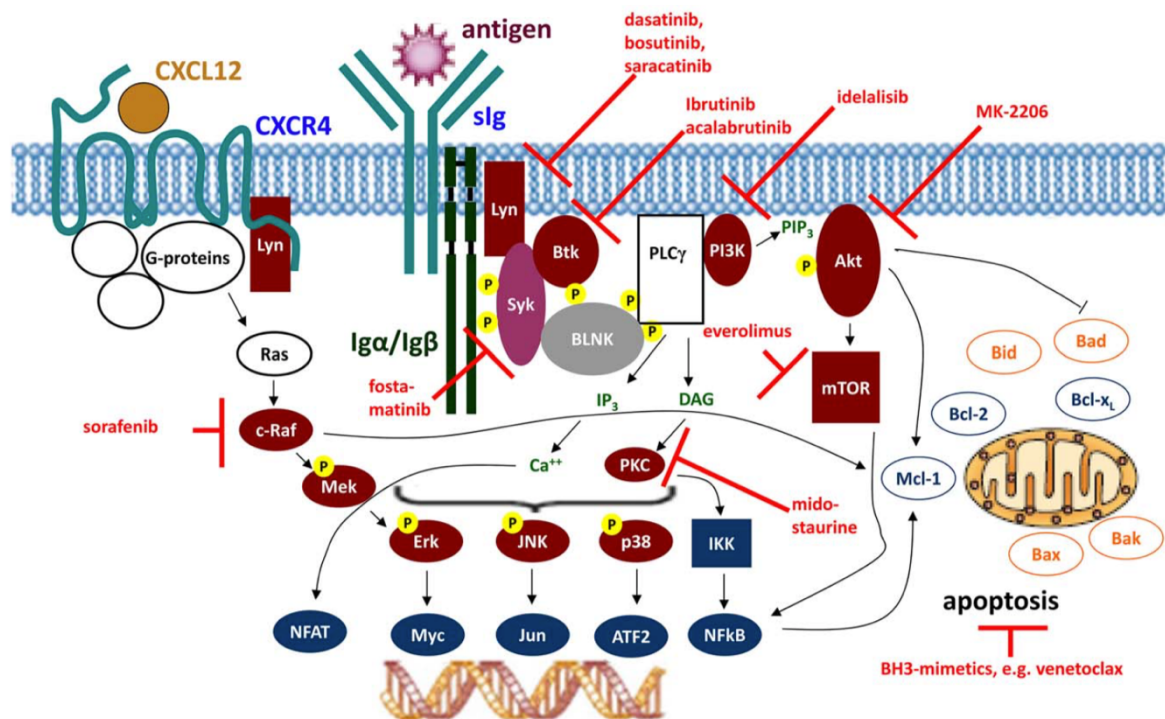


Figure 12 : Ciblage thérapeutique de voies de signalisation spécifiques pour le traitement de la LLC.

Extrait de Hallek, 2017

**L'ibrutinib** : L'ibrutinib est un inhibiteur irréversible de Btk, par création d'un lien covalent avec le résidu C481 sur le site actif de Btk. L'inactivation de Btk entraîne une inhibition de la voie de signalisation du BCR et donc de la survie et de la prolifération. Mais Btk est également impliquée dans la signalisation des intégrines et des récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CXCR5 et son inhibition affecte donc la migration des cellules leucémiques et leur homing tissulaire (Burger and Buggy, 2013; de Gorter et al., 2007; Spaargaren et al., 2003). Plus de 85% des patients présentent une bonne réponse au traitement, quelles que soient leurs caractéristiques cliniques et les facteurs de risques exprimés. Le traitement à l'ibrutinib n'entraîne que très peu d'effets secondaires. Suite à la première administration, les cellules leucémiques sont relarguées des tissus lymphoïdes vers la circulation sanguine. Compte tenu de la longévité importante de ces cellules circulantes, la lymphocytose peut être durable mais n'impacte pas la survie globale des patients. La monothérapie à l'ibrutinib est aujourd'hui l'approche standard de traitement de première ligne, de même que pour les patients en rechute

ou réfractaires aux autres thérapies (O'Brien et al., 2018; Woyach et al., 2014a). Cependant les réponses des patients sont en règle générale partielles, avec un niveau faible de pathologie persistante, et des combinaisons d'ibrutinib avec des anticorps anti-CD20 ou des chimiothérapies sont actuellement en cours d'essai clinique. Malgré l'efficacité de ce traitement, certains patients doivent le suspendre à cause d'effets indésirables, d'autres patients, rares, peuvent développer des résistances à l'ibrutinib, ce sont généralement des patients présentant des LLC à risque élevé. La résistance à l'ibrutinib peut également apparaître suite à une évolution clonale du gène *BTK* au niveau du site de liaison de l'ibrutinib (Ahn et al., 2017; Burger et al., 2016; Thompson et al., 2015; Woyach et al., 2014b, 2017). Des inhibiteurs de Btk de seconde génération sont actuellement en cours de développement ou d'essai cliniques. L'acalabrutinib, le tirabrutinib, le zanubrutinib et le SNS-062 ont tous un mécanisme de fonctionnement similaire à l'ibrutinib, tout en étant plus spécifique, de meilleures réponses des patients associées à des toxicités diminuées sont donc attendues (Burger and O'Brien, 2018).

***L'idelalisib*** : l'idelalisib est un inhibiteur sélectif réversible de PI3K $\delta$ , entraînant une inhibition de la voie de signalisation du BCR, de la phosphorylation d'AKT et ainsi, perturbe les interactions entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement (Brown et al., 2014; Hoellenriegel et al., 2011; Lannutti et al., 2011). De façon similaire à l'ibrutinib, l'idelalisib entraîne donc une lymphocytose de redistribution, qui est persistante pour beaucoup de patients (Brown et al., 2014). La persistance de la lymphocytose a conduit à préconiser une combinaison d'idelalisib et de rituximab. Testée sur des patients en rechute ou réfractaires, cette combinaison montre de très bons résultats, améliorant la survie sans progression et la survie globale des patients, et est donc conseillée pour ces patients (Furman et al., 2014). Testé à plus large spectre, sur des patients naïfs de traitements, seul ou en combinaison, l'idelalisib a montré de nombreux effets indésirables (neutropénies, diarrhées et/ou coliques, transaminases hépatiques, hépatotoxiques, infections opportunistes), d'origine auto-immune pour certains (Ali et al., 2014; Jones et al., 2017; Smith et al., 2017; Zelenetz et al., 2017), et il a été conclu qu'un traitement avec l'idelalisib n'était préconisé que pour les patients ayant des contre-indications ou des intolérances à l'ibrutinib, ou si la pathologie a montré des signes de progression sous traitement avec un inhibiteur de Btk (Burger and O'Brien, 2018). Deux autres inhibiteurs de PI3K, le Duvelisib et l'Umbralisib, sont

actuellement en cours d'essai clinique, et montrent des résultats prometteurs pour le traitement de patients LLC en rechute et/ou réfractaires aux autres traitements.

**Le venetoclax :** le venetoclax est une petite molécule, très sélective et avec un effet inhibiteur puissant sur la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Son utilisation seule entraîne des réponses chez 80% des patients, et une rémission complète pour 20%. La survie sans progression des patients est améliorée, et les patients LLC à risque élevé répondent bien au traitement (Roberts et al., 2016). Les effets secondaires sont minimes. Le venetoclax peut être utilisé en combinaison avec le rituximab, avec des résultats améliorés, jusqu'à 41% de rémission complète et une survie globale améliorée pour des patients en rechute et/ou réfractaires aux autres traitements (Ma et al., 2015; Seymour et al., 2018). De plus, l'administration de venetoclax à des patients résistants à l'ibrutinib et/ou à l'idelalisib entraîne 56% de rémissions partielles et 9% de rémissions complètes (Jones et al., 2018). Le venetoclax est autorisé aux États-Unis pour traitement des patients avec une délétion 17p qui ont résistés à un traitement de première ligne ainsi que pour des patients dont la maladie a progressé sous traitement à l'ibrutinib ou à l'idelalisib. Les résultats encourageants prédisent une utilisation plus précoce et pour des patients à risque plus faible dans un futur proche (Burger and O'Brien, 2018).

Ces trois inhibiteurs constituent actuellement les traitements les plus courants de la LLC mais d'autres existent également. On peut noter les inhibiteurs de SYK, et le datasinib, un inhibiteur de Src, qui ne sont que peu ou pas utilisés. De nouveaux anticorps anti-CD20 ont également été développés, l'Ofatumumab et l'Obinutuzumab, qui seraient plus efficaces que le rituximab et utilisés en combinaison avec les chimiothérapies ou les inhibiteurs de Btk. Le Lenalidomide, un immunomodulateur a démontré son efficacité, mais n'est que peu utilisé car celle-ci reste inférieure à celles des inhibiteurs de Btk, PI3K et Bcl-2. Pour les patients avec un risque élevé, del17p, TP53 muté, ou avec des caryotypes complexes, deux approches sont encore possibles bien que réservées à des cas très rares, la thérapie par les « CAR T cells » et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues. (Burger and O'Brien, 2018)

### **I.7.3. La thérapie individualisée de la LLC**

La variété des traitements disponible aujourd'hui, que ce soit en première ligne ou après échec de ce premier traitement, permet une approche individualisée de la thérapie à mettre en place en se basant sur les observations cliniques et les facteurs de risque individuels des patients (Figure 13). Pour les patients plus jeunes et présentant un LLC à faible risque, le

traitement de prédilection reste la combinaison FCR ou la combinaison BR, une chimio-immunothérapie intense mais qui induit une rémission la plus durable. Une approche avec un suivi de la réponse personnalisée permettrait d'arrêter le traitement avant la fin des six cycles classiques pour les patients présentant une rémission plus précoce, afin de limiter les effets indésirables (Jain et al., 2017a; Keating et al., 2005; Thompson et al., 2016). Pour les patients plus âgés et avec des comorbidités, la combinaison Chlorambucil et Rituximab reste une option viable (Goede et al., 2014; Hillmen et al., 2015), mais il est aujourd'hui suggéré de s'orienter vers un traitement à l'ibrutinib (Burger et al., 2015). Les patients avec des LLC à faible risque en rechute sont ensuite traités de manière générale avec un inhibiteur de kinases (ibrutinib ou idelalisib).

Pour les patients avec des LLC à haut risque, le traitement de première ligne recommandé est un inhibiteur de Btk. Ces inhibiteurs sont particulièrement indiqués dans les cas de délétion 17p, mais également de délétion 11q ou des cas avec *IGHV* non-muté (Hallek et al., 2010). Malgré une bonne réponse en première ligne ou suite à une rechute, le problème principal de ce traitement est sa poursuite dans le temps, dû au fait que les patients n'entrent pas en rémission complète, qui peut faire émerger des toxicités, représente un coût de traitement important et présente un risque d'apparition de résistances (Burger et al., 2016; Landau et al., 2017; Maddocks et al., 2015; Woyach et al., 2014b). Les patients délétés 17p et/ou mutés *TP53* présentent un risque élevé de développer des résistances à l'ibrutinib (et potentiellement aux autres inhibiteurs de Btk), et même s'ils peuvent dans certains cas répondre au venetoclax (Jones et al., 2018), il est conseillé de s'orienter vers des transplantations ou des thérapies aux « CAR T cells » qui constitueront probablement la meilleure alternative dans le futur (Burger and O'Brien, 2018). Les patients intolérants à l'ibrutinib présentent une bonne réponse à l'idelalisib (Mato et al., 2017) et au venetoclax qui est le plus fréquemment utilisé dans ces cas (Jones et al., 2018). Les combinaisons venetoclax et rituximab ont également montré d'excellent résultats et pourraient être utilisées en première ligne dans le futur (Seymour et al., 2018). La limite actuelle de ces traitements est leur durée dans le temps, car n'entraînant pas systématiquement de rémissions complètes, et pouvant induire des effets indésirables et des résistances. Une perspective pour limiter cette durée de traitement serait la combinaison d'ibrutinib et de venetoclax qui semblerait induire des rémissions durables (Jain et al., 2017b).

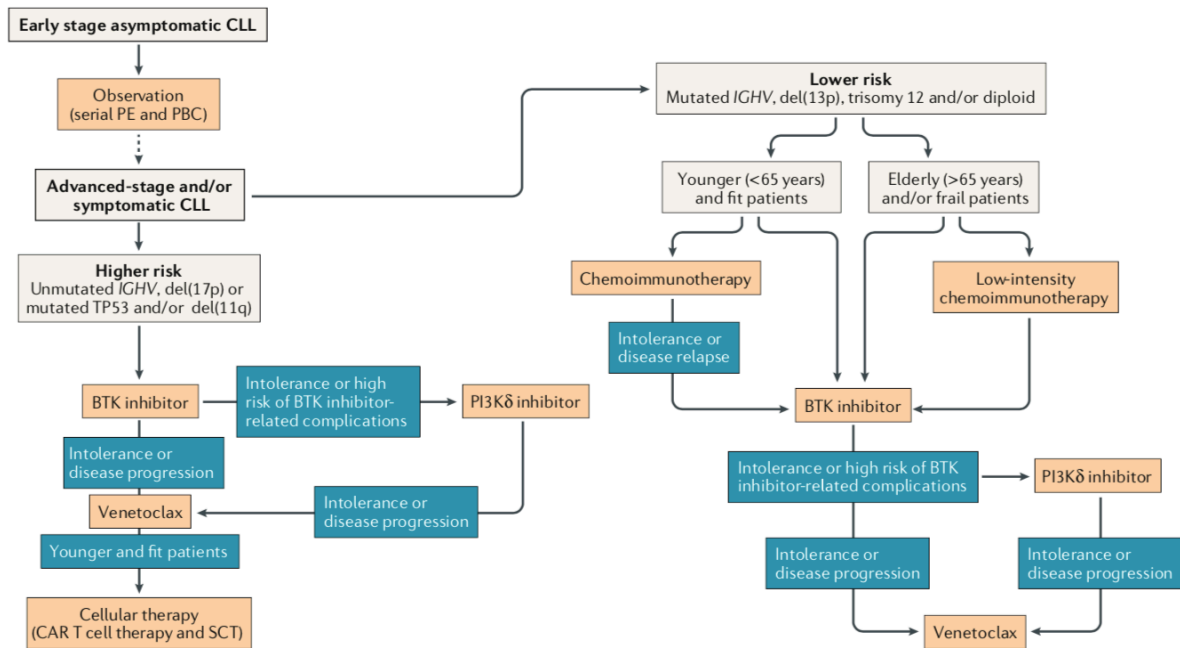


Figure 13 : Approche thérapeutique individualisée pour les patients atteints de LLC.

Extrait de Burger and O'Brien, 2018

## Chapitre II. Le microenvironnement tumoral de la Leucémie Lymphoïde Chronique

### II.1. Le microenvironnement et la progression tumorale

Le microenvironnement tumoral (MET) est défini comme l'ensemble des composantes entourant et interagissant avec les cellules tumorales, comprenant des cellules non-tumorales, la matrice extracellulaire (MEC), les vaisseaux sanguins et des molécules de signalisation (Junttila and de Sauvage, 2013; Quail and Joyce, 2013; Swartz et al., 2012). Ce microenvironnement est un milieu complexe en évolution permanente au cours de la progression tumorale (Witz and Levy-Nissenbaum, 2006). Il est apparu évident durant les dernières années que les caractéristiques principales des cellules tumorales (Figure 14) étaient en partie régulée par les acteurs du MET.

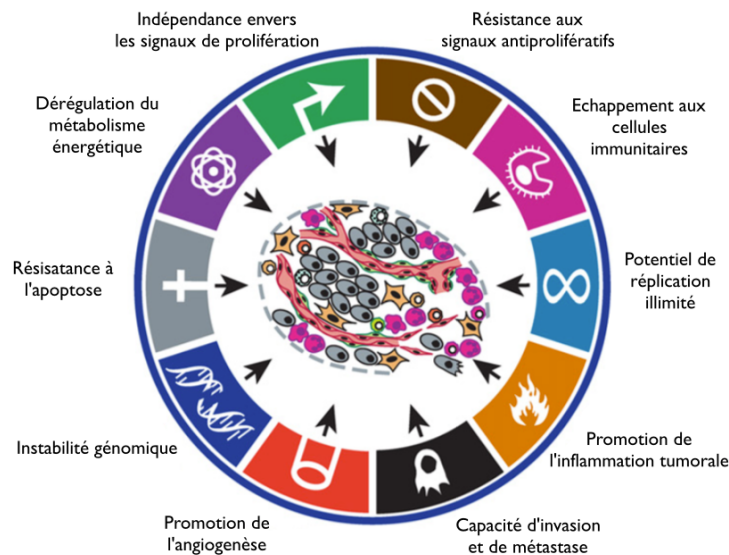


Figure 14 : Caractéristiques des cellules tumorales dans leur microenvironnement.

Adapté de Hanahan and Weinberg, 2011

Le microenvironnement des cellules tumorales joue un rôle crucial pour leur survie, leur croissance et leur progression. Il a également été montré que ce microenvironnement, et notamment au niveau des sites de métastases, était impliqué dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies (Ribatti et al., 2006). L'étude des mécanismes mis en jeu par le microenvironnement pour promouvoir la progression tumorale et la chimiorésistance est ainsi

devenue d'un enjeu capital, et le microenvironnement pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des cancers.

## II.2. Les acteurs du microenvironnement tumoral et leurs mécanismes d'action

Différents types de cellules normales sont présentes au sein du MET, les cellules stromales, des fibroblastes, des cellules immunitaires (lymphocytes T et B, macrophages associés aux tumeurs et cellules Natural Killer...) ainsi que des péricytes et plus rarement des adipocytes (Figure 15).

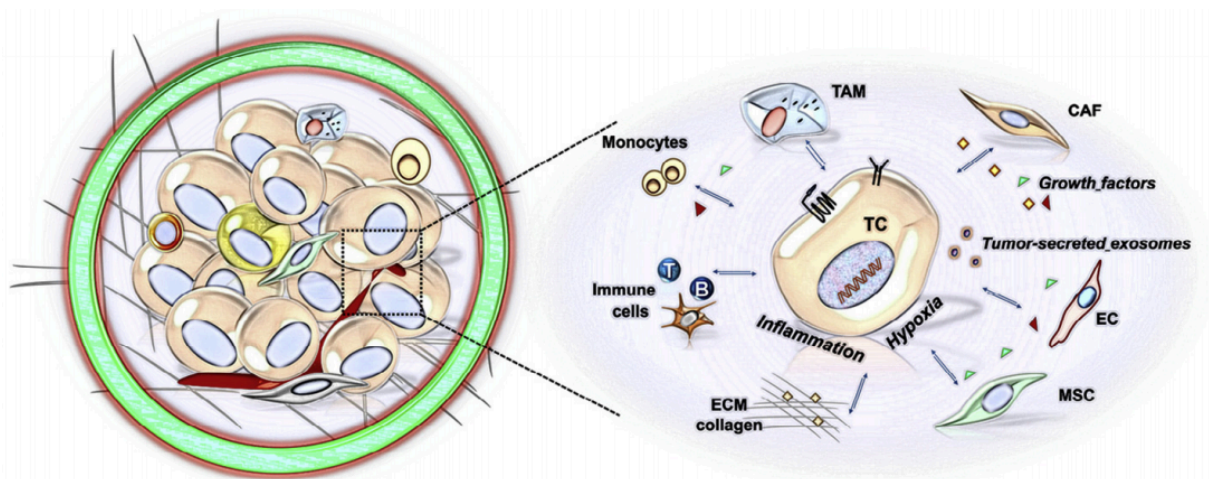


Figure 15 : Le microenvironnement tumoral

(TC=Tumor Cell, TAM=Tumor-Associated Macrophages, CAF=Cancer-Associated Fibroblasts, EC=Endothelial Cells, MSC=Mesenchymal Stem/Stromal Cell, ECM=Extracellular Matrix).

Extrait de Hui and Chen, 2015

Les fibroblastes et les cellules stromales contribuent à la croissance et à la survie des cellules tumorales par la sécrétion de facteurs de croissance tels que le FGF (*fibroblast growth factor*) ou l'HGF (*hepatocyte growth factor*), de même qu'à la chimioattraction d'autres cellules par la sécrétion de CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*) (Hanahan and Coussens, 2012).

La MEC joue également un rôle majeur dans la progression tumorale. Elle est composée de protéines, glycoprotéines, protéoglycanes, et polysaccharides, fournissant aux cellules tumorales un échafaudage physique de même qu'une pléthore de facteurs de croissance. Différentes cellules du MET produisent des protéines de la MEC et ce remodelage de la MEC promeut la progression tumorale, facilite l'angiogenèse et l'inflammation, et

dérégule le comportement des cellules stromales (Lu et al., 2012). Additionnellement, la structure de la vascularisation des tumeurs est anormale et les signaux angiogéniques émis par le MET ne font que l'accentuer, conduisant à des tumeurs présentant des régions hypoxiques et acides, tout en limitant l'apport des traitements à la tumeur (Carmeliet and Jain, 2011).

Les tumeurs montrent un infiltrat de cellules immunitaires, ce qui était communément assimilé à une réponse immunitaire, afin d'empêcher et inhiber la progression tumorale. Au contraire, des études récentes tendent à montrer un rôle pro-tumoral de certaines cellules immunitaires (macrophages, Treg...) en interaction avec les cellules tumorales (Gajewski et al., 2013; Zamarron and Chen, 2011). Les tumeurs semblent également modifier leur environnement au cours de leur progression, certains des mécanismes sont similaires à ceux observés lors d'inflammations chroniques, et sont favorables à la survie de la tumeur (Grivennikov et al., 2010). De plus, le microenvironnement est généralement immunosuppresseur, empêchant la mise en place d'une immunité anti-tumorale efficace.

Parmi ces cellules immunitaires infiltrantes, on observe différentes populations de lymphocytes T. Des LT CD8<sup>+</sup> mémoires et des CD4<sup>+</sup> T helper 1 (Th1), produisant massivement de l'IFN- $\gamma$  (Interféron gamma), leur conférant ainsi un rôle inhibiteur du développement tumoral (Fridman et al., 2012). Mais on observe aussi des Th2 CD4<sup>+</sup>, des Th17 et des Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) qui ont des rôles contradictoires selon les études et les modèles de cancers analysés. Des lymphocytes B ont également été observés, produisant des cytokines pro-tumorales, et donc de mauvais pronostic, tandis que les cellules NK (*natural killer*) seraient anti-tumorales et de bon pronostic (Balkwill et al., 2012; Tachibana et al., 2005). Des cellules myéloïdes sont aussi présentes dans le MET. Les cellules myéloïdes suppressives (précurseurs des cellules dendritiques, macrophages et granulocytes), stimulent la vascularisation et dérégulent la présentation antigénique aux LT et la fonction des NK et donc l'immuno-surveillance. Les mastocytes sont quant à eux recrutés au niveau des tumeurs, où ils produisent des facteurs augmentant la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse tumorale (Balkwill et al., 2012). Deux types de macrophages associés aux tumeurs (TAM) peuvent être observés, des macrophages de type M1 ayant une activité anti-tumorale et/ou des macrophages de type M2, pro-tumoraux.



## II.3. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

### II.3.1. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules myéloïdes de l'immunité innée qui ont pour fonction d'éliminer les cellules mortes, au cours du développement et de la vie adulte, ainsi que de protéger l'hôte par leur activité de phagocytose des pathogènes et de présentation antigénique. Les macrophages sont résidents des tissus et ils proviennent de la différenciation de monocytes ayant migrés de la circulation sanguine vers les sites inflammatoires tissulaires. Ils peuvent être séparés en deux catégories, les macrophages de type 1 (M1), classiquement pro-inflammatoires, et les macrophages de type 2 (M2), immunomodulateurs. Un même macrophage peut passer d'un type M1 à un type M2 et inversement, et cette polarisation est dépendante des stimuli reçus (environnement cytokinique et chimiokinique) par le macrophage (Davis et al., 2013; Mills and Ley, 2014).

Les macrophages de type M1 ont un rôle pro-inflammatoire (Figure 16) et sont caractérisés par une forte production de TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) et de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-12 et IL-23 (Mantovani et al., 2002). La voie classique d'activation des macrophages entraîne leur polarisation en phénotype M1. Trois signaux principaux sont associés à la polarisation M1. Premièrement, les agonistes des *Toll Like Receptors* (TLR), notamment le lipopolysaccharide (LPS), activent TLR4, conférant aux cellules un fort profil pro-inflammatoire (IFN- $\beta$ , IL-12, TNF, IL-6, CCL2, CXCL10, CXCL11). Les cytokines produites par les LT Th1, principalement l'IFN- $\gamma$ , induisent l'expression de récepteurs aux cytokines et de marqueurs d'activation cellulaire caractéristiques des macrophages M1. La polarisation M1 induite par l'IFN- $\gamma$  et le LPS entraîne la production par les macrophages de TNF- $\alpha$ , qui accentue de façon autocrine l'activation M1. Enfin, le *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) entraîne également la polarisation M1, avec des profils similaires à ceux induits par l'IFN- $\gamma$  et le LPS mais associés à des productions moins importantes de cytokines (Martinez and Gordon, 2014).

Les voies alternatives d'activation des macrophages induisent des phénotypes M2, divisés en quatre sous-groupes, M2a, b, c et d, se distinguant par des expressions géniques différentes. Les stimuli d'activation sont également différents, la polarisation M2a dépend des cytokines produites par les Th2, IL-4 et IL-13, la polarisation M2b par les complexes immuns et les ligands du récepteur IL-1R, la polarisation M2c par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le

TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*), tandis que les macrophages M2d dépendent de l'IL-6 et de l'adénosine (Duluc et al., 2007). Par ailleurs, les macrophages associés aux tumeurs sont très similaires aux macrophages M2d (Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012). Les macrophages de type M2 sont caractérisés par une forte activité de phagocytose, associée à un niveau élevé d'expression des récepteurs *scavengers*, de même que par une forte production de TGF- $\beta$ , de prostaglandines et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Figure 16).

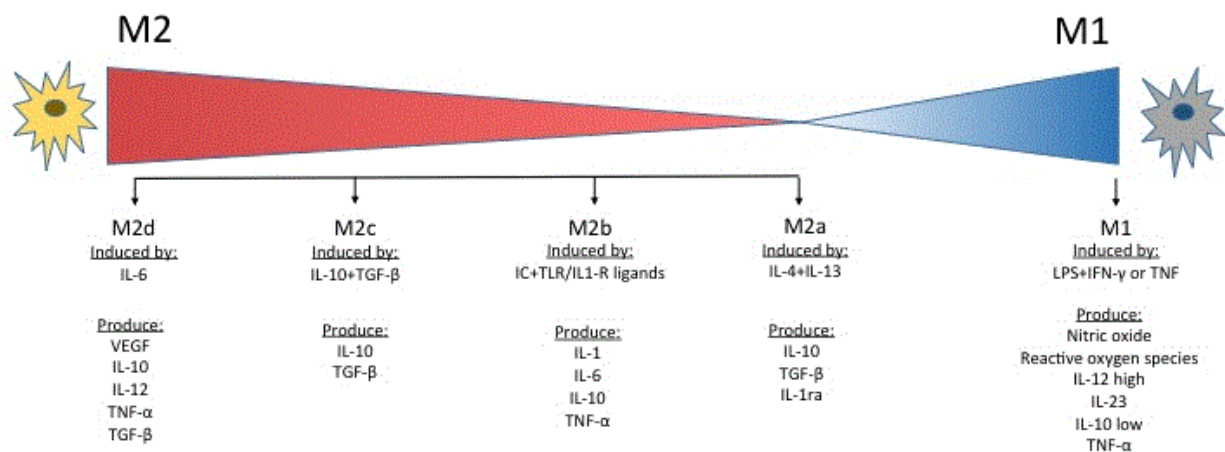


Figure 16 : Polarisation et phénotypes M1/M2.

D'après Weagel et al., 2015

### II.3.2. Les macrophages dans les tumeurs

Les TAMs sont localisés en grande quantité dans les tissus tumoraux, où ils contrôlent l'apparition, le développement et la migration des cellules tumorales. L'interaction entre les TAMs du microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses est d'une importance capitale, et constitue l'une des dix caractéristiques principales du cancer (Colotta et al., 2009).

#### II.3.2.1. Origine et différenciation des macrophages

Les macrophages ont trois origines distinctes possibles, ils peuvent provenir de la différenciation de monocytes sanguins issus de la moelle osseuse, mais également de macrophages précurseurs d'origine embryonnaire, ainsi que des cellules myéloïdes suppressives immatures, ou M-MDSC (*monocyte-related myeloid-derived suppressor cells*) sanguines recrutées par la tumeur. Les différences de fonction des macrophages observées dans divers organes pourraient s'expliquer par cette origine variable (Biswas and Mantovani, 2010; Mantovani et al., 2017; Perdiguero and Geissmann, 2013; Schulz et al., 2012). Le

recrutement des monocytes dans la tumeur s'effectue dans un contexte inflammatoire par le biais de facteurs sécrétés par les cellules tumorales et les cellules du MET. Ainsi, les monocytes sont attirés par les chimiokines pro-inflammatoires sécrétées par la tumeur : CCL3 (*chemokine ligand 3*), CCL5, CCL7, CCL8 et la plus importante CCL2, fortement associée à l'invasion de la tumeur par les TAMs et à la progression tumorale (Ohtaki et al., 2010). Mais d'autres facteurs attirent également les monocytes, le VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le CSF-1 (*colony stimulating factor 1*), de même que CXCL8 et CXCL1 dont l'action est renforcée par l'IL-4 et l'IL-13 (Allavena and Mantovani, 2012).

Les monocytes ainsi recrutés se différencient au sein de la tumeur en macrophages M1 ou M2 selon les signaux activateurs reçus. Les deux types de macrophages sont détectés au sein des tumeurs. La différenciation en M1, par des cytokines Th1 pro-inflammatoires, accentue la production de cytokines pro-inflammatoires et d'activateurs de la réponse immunitaire, stimulant ainsi l'inflammation et les fonctions anti-tumorales (Zhao et al., 2014). Cependant la grande majorité des TAMs correspondent plutôt à des macrophages M2. La polarisation M2 peut être activée par CCL2 (en plus de son rôle de recrutement des monocytes), de même que par l'IL-6, le CSF-1, le TGF- $\beta$ , la prostaglandine E2, les glucocorticoïdes et les cytokines IL-4 et IL-13 (Gu et al., 2000; Josephs et al., 2015; Sierra-Filardi et al., 2014). Les conditions hypoxiques ou inflammatoires associées à de hauts niveaux d'acide lactique favorisent également la polarisation M2. De plus, les macrophages M2 sécrètent des antagonistes de l'IL-1R, des métalloprotéases, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , également impliqués dans le recrutement des monocytes et la polarisation M2, suggérant un rétrocontrôle positif des TAMs sur leur propre différenciation. Par le même biais, les macrophages M2 exercent des rôles pro-tumoraux, tout en inhibant l'immunité T (Mira et al., 2013).

Il est important de noter que la polarisation M1 ou M2 est interchangeable et dépend de signaux en provenance du microenvironnement tumoral. Ainsi, une majorité des macrophages M1 sera modifiée en macrophages M2, et le déséquilibre de la balance en faveur des macrophages M2 est associé à la progression de la tumeur (Gordon and Mantovani, 2011; Mantovani and Locati, 2013; Zaynagetdinov et al., 2011).

La plupart de TAMs présentent un phénotype proche des macrophages M2, avec une expression des protéines de la famille de l'arginase et la chitinase, de MGL (*macrophage galactose lectin*), une forte sécrétion de métalloprotéases, VEGF, TGF- $\beta$  et IL-10, et une

faible expression d'IL-12, caractérisant un phénotype immunosuppresseur (Hagemann et al., 2006). Les TAMs sont cependant très hétérogènes et certains présentent des facteurs associés aux macrophages M1, tels que CCL5, CXCL9, CXCL10 et CXCL16. Dans une même tumeur sont observés des TAMs différents selon la localisation, ce polymorphisme des TAMs découlant des signaux variés émanant du microenvironnement (Allavena et al., 2010).

Comme toutes les cellules myéloïdes, les TAMs expriment le CD14 et le CD11b. De façon similaire aux M2, les TAMs ont de faibles niveaux d'expression de CMH de classe I et II et de CD64. Ils expriment un récepteur du mannose, le CD206, et deux récepteurs scavenger, le CD163 et le CD206, de même qu'un niveau élevé de CD68. Le co-marquage CD68/CD163 est utilisé classiquement pour identifier les TAMs.

### II.3.2.2. Fonctions des TAMs

Plusieurs fonctions des TAMs leur permettent de promouvoir le développement des tumeurs. Ils augmentent le recrutement monocyttaire, stimulent l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, favorisent la croissance, l'invasion et les métastases, et perturbent la réponse immunitaire anti-tumorale (Hao et al., 2012).

Comme mentionné précédemment, les TAMs stimulent le recrutement des monocytes, leur différenciation et polarisation en macrophages M2, par la production de CCL2, CXCL12, IL-10, TGF- $\beta$  et VEGF (Murdoch et al., 2004; Siveen and Kuttan, 2009).

Les TAMs stimulent la mise en place de la néo-angiogenèse tumorale. En effet, en présence de TAMs, l'initiation de l'angiogenèse est plus précoce qu'en présence de cellules tumorales seules (Bingle et al., 2002). Les TAMs sécrètent les facteurs de croissance nécessaires à cette initiation tels que le VEGF, PDGF, TGF- $\beta$  et FGF (*fibroblast growth factor*) (Siveen and Kuttan, 2009), ainsi que des protéases telles que l'urokinase, la plasmine, et des métalloprotéases matricielles (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-4, MMP-9 et MMP-12). La plus importante de ces dernières étant la MMP-9 qui permet la dégradation de la MEC et la stimulation de la sécrétion des facteurs de croissance (Giraudo et al., 2004; Vérollet et al., 2011). Il a été observé que les TAMs s'accumulent dans les régions hypoxiques, où les facteurs de transcription HIF-1 (*Hypoxia-Induced Factor-1*) et HIF-2 activent l'expression des gènes pro-angiogéniques VEGF-A, FGF, CXCL8, et également CXCL12 qui permet l'attraction des cellules endothéliales exprimant son récepteur CXCR4 (Guruvayoorappan, 2008; Schioppa et al., 2003). En plus de l'angiogenèse, il a été montré que les TAMs seraient impliqués dans l'initiation de la lymphangiogenèse, étape initiale dans la dissémination des

cellules tumorales, par la production de VEGF-C et VEGF-D, ainsi que d'autres facteurs de croissance endothéliaux lymphatiques (Ji, 2006; Miyata et al., 2006; Schoppmann et al., 2002).

En association avec l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, les TAMs favorisent la croissance tumorale. L'expression de MMP-9, stimulée par l'IL-23, est étroitement liée à la croissance tumorale (Erreni et al., 2010; Huang et al., 2002). Les TAMs produisent d'importantes quantités d'IL-10, inhibant la réponse lymphocytaire T cytotoxique (Guruvayoorappan, 2008). L'infiltration des tumeurs par les TAMs est également corrélée à une augmentation de la prolifération des cellules tumorales (Lewis and Pollard, 2006; Tsutsui et al., 2005).

Le microenvironnement peut être remodelé par les TAMs, notamment par le biais des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 qui dégradent les protéines de la MEC, favorisant ainsi les métastases (Guruvayoorappan, 2008). D'autres facteurs produits par les TAMs promeuvent les métastases, tels que l'IL-1 $\beta$ , la cathepsine B, Wnt5a et la semaphorine 4D (Coffelt et al., 2009).

Enfin les TAMs ont un rôle immunosuppresseur, favorisant la croissance tumorale. Ces effets immunosuppresseurs relèvent de plusieurs mécanismes. Les cytokines sécrétées par les TAM contribuent à l'immunosuppression. Le TGF $\beta$  inhibe les activités cytolytiques des cellules NK et des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Castriconi et al., 2003; Flavell et al., 2010) et stimule l'apoptose des cellules dendritiques, diminuant ainsi la présentation antigénique et donc la réponse immunitaire adaptative anti-tumorale (Ito et al., 2006; Weber et al., 2005). Il permet également le maintien de la différenciation des Treg, inhibiteurs de la réponse anti-tumorale (Flavell et al., 2010), et favorise la polarisation des TAMs vers un phénotype M2, augmentant sa propre expression et accroissant l'immunosuppression (Mantovani and Sica, 2010). L'IL-10 a également un rôle immunosuppresseur en inhibant la production d'IL-12, une cytokine anti-tumorale (Matsuda et al., 2015), et d'IFN- $\gamma$ , activant les LT cytotoxiques et NK (Sica et al., 2000). L'IL-10 inhibe également la présentation des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques et les autres cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Beissert et al., 1995; Qin et al., 1997). Les TAMs induisent aussi la suppression des LT par la sécrétion de prostaglandine E2, d'arginase et l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase-1 (IDO1), qui dégrade le tryptophane nécessaire à la survie des lymphocytes T. L'inhibition des cellules NK est également associée à leur expression de molécules HLA (*human leukocyte antigen*) G et E inhibitrices (Caux et al., 2016).

L'expression de molécules inhibitrices (*check point inhibitors*) a également été identifiée au niveau des TAM. Il s'agit principalement du ligand de PD-1 (*Programmed cell death protein 1*), PD-L1 (*programmed death-1 ligand 1*) qui est exprimé par les TAMs infiltrants les tumeurs, dans des modèles de cancer ORL (Kubota et al., 2017), de mélanome et de cancer du sein (Hartley et al., 2018). Cette expression est associée à la suppression de leur fonction phagocytaire au contact du ligand exprimé par les cellules tumorales. De même, dans le contexte des lymphomes à grandes cellules B ainsi que dans les lymphomes hodgkiniens, l'expression de PD-L1 est détectée au niveau des TAM (Menguy et al., 2018; Vari et al., 2018). Ces molécules inhibitrices des TAMs inhibent l'activation des lymphocytes T et augmentent la progression tumorale.

Certaines études ont fait état d'interactions entre les TAMs et les cellules souches cancéreuses (CSC). Les CSCs et les TAMs sont détectés à proximité dans les tissus, et le nombre de TAMs est fortement corrélé au nombre de CSCs (Zeppernick et al., 2008). Les CSCs produiraient des chimioattractants stimulant l'infiltration des macrophages au sein de la tumeur (Yi et al., 2011) et les TAMs favoriseraient la prolifération et l'invasion métastatique des CSCs (Hao et al., 2012; Okuda et al., 2012).

L'ensemble des fonctions des TAMs dans la progression tumorale sont résumées dans la Figure 17.

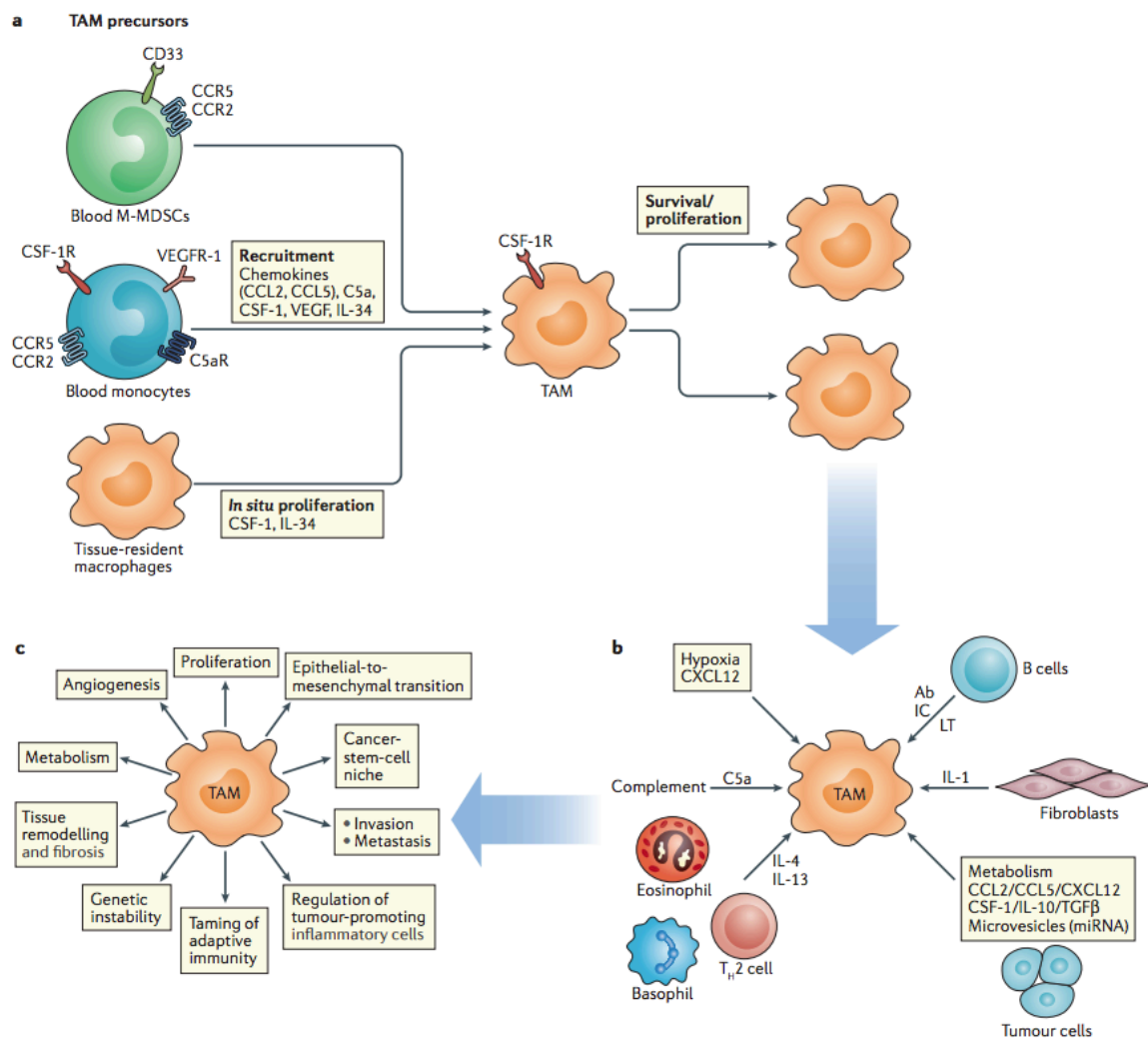


Figure 17 : Origine, différenciation et fonctions des macrophages associés aux tumeurs.

a) origine et recrutement des TAMs. b) Signaux de polarisation des TAMs en M2. c) Fonctions des TAMs au sein de la tumeur. Extrait de Mantovani et al., 2017

### II.3.2.3. Macrophages et thérapies

Certaines chimiothérapies induisent une modulation de l'activité des macrophages, qui affectent l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Dans certains cas, cette modulation peut avoir un effet positif sur l'efficacité du traitement. Ainsi, on peut noter que les traitements à la doxorubicine, à l'imatinib/sorafenib ou à la trabectedine induisent respectivement, une augmentation de l'immunité anti-tumorale par la présentation des antigènes tumoraux, une repolarisation vers un phénotype effecteur M1, et une déplétion de la tumeur en TAMs associée à une diminution de l'angiogenèse (Mantovani et al., 2017). En revanche, les TAMs, de phénotype M2, sont plus généralement associés à la résistance aux chimiothérapies telles que les agents contenant du platine, le paclitaxel et la doxorubicine. Les TAMs peuvent s'accumuler dans les zones périvasculaires et induire la revascularisation de la tumeur après

traitement et la récurrence du patient. De même, les TAMs permettent le recrutement de cellules myéloïdes immunosuppressives et la différenciation de Th17 pro-tumoraux, et protègent également les cellules souches cancéreuses contre l'effet cytotoxique des traitements (Bruchard et al., 2013; Hughes et al., 2015; Mitchem et al., 2013).

Les TAMs sont impliqués dans la modulation de l'efficacité d'autres thérapies. Dans les cas de cancers de la prostate, un traitement aux bloqueurs d'androgènes induit une forte production de CSF-1 par les cellules tumorales et donc un recrutement accru de TAMs (Escamilla et al., 2015). Le VEGF et l'angiopoiétine-2 sont associés au recrutement des monocytes par la stimulation de la production de CSF-1 et confèrent aux TAMs un phénotype pro-angiogénique associé à la résistance aux traitements ciblant les voies de l'angiogenèse (Coffelt et al., 2010; Qian et al., 2015).

Compte tenu de leur implication dans la progression tumorale et dans la résistance thérapeutique, les TAMs constituent une cible thérapeutique potentielle non négligeable. Plusieurs traitements ont ainsi été développés, ciblant les fonctions des TAMs (inhibiteurs de l'IL-6, de l'IL-6R et du TNF- $\alpha$ ), mais également le recrutement des monocytes (inhibiteurs du récepteur de CSF-1, de CCL2...) et la polarisation en macrophages M2 (inhibiteurs de l'IL-4 et de son récepteur, ou de l'IL-13). Un certain nombre d'entre eux sont en cours d'essai clinique, les plus prometteurs étant probablement les antagonistes de CSF-1R. En monothérapie, l'inhibition de CSF-1R inhibe la croissance des cellules d'adénocarcinome pancréatique, de cancer du col utérin et induit la régression de glioblastomes multiformes. Dans d'autres modèles tumoraux, ils peuvent être utilisés en combinaison avec des chimiothérapies, la radiothérapie, des inhibiteurs de l'angiogenèse ou des inhibiteurs de checkpoint immunitaires. Dans ce contexte, l'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/ PD-L1 des TAMs est une nouvelle voie thérapeutique qui rétablit les fonctions immunitaires effectrices dans différents modèles hématologiques et de cancers solides (Suda, 2017). Ces thérapies permettraient d'obtenir des réponses plus efficaces et plus durables (Ruffell and Coussens, 2015). D'autres axes sont prometteurs, notamment les traitements aux biphosphonates ou à la trabectedine qui induisent une déplétion de la population de TAMs, ou encore l'utilisation d'anticorps anti-CD47 ciblant la cellule tumorale pour rétablir la fonction de phagocytose des macrophages et d'activation de l'immunité adaptative anti-tumorale (Mantovani et al., 2017). Les stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs sont résumées en Figure 18.



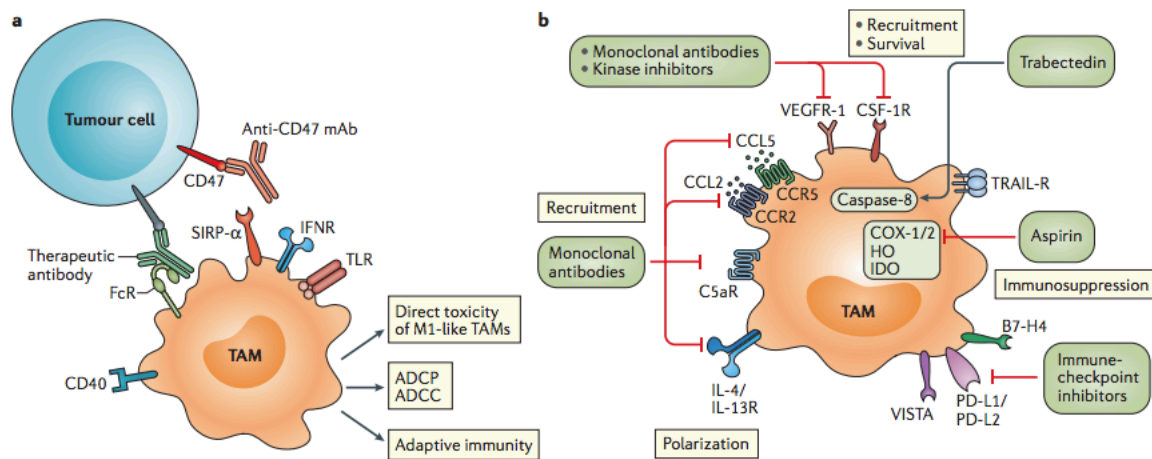


Figure 18 : Stratégie de ciblage thérapeutique des TAMs.

(ADCP : antibody-dependent phagocytosis ; ADCC : antibody-dependent cytotoxicity). Extrait de Mantovani et al., 2017.

### II.3.3. Les « nurse-like cells », les TAMs spécifiques de la LLC

Au sein du microenvironnement de la LLC dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, des cellules particulières sont présentes, appelées « *nurse-like cells* », c'est-à-dire des cellules qualifiées de nourricières, suspectées de « nourrir » les cellules leucémiques par la sécrétion de facteurs de croissance et de survie. Elles peuvent présenter deux morphologies, soit des cellules larges, rondes et adhérentes, soit des cellules morphologiquement proches de fibroblastes. Les NLCs *in vivo* et celles obtenues *in vitro* expriment des marqueurs macrophagiques CD11b, CD14, CD68, CD80, CD86, CD163 et CD206, des marqueurs de cellules stromales tels que la vimentine et STRO-1, et sont positives pour l'indoleamine 2-3 dioxygénase (IDO) (Burger et al., 2000; Giannoni et al., 2014; Jia et al., 2014; Tsukada et al., 2002; Ysebaert and Fournié, 2011). Les NLCs sont issues des monocytes CD14<sup>+</sup> du sang périphérique, qui se différencient en NLCs au contact des cellules leucémiques, dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate (Filip et al., 2013; Tsukada et al., 2002). Les mécanismes de différenciation *in vitro* ne sont pas à ce jour totalement identifiés. La forme soluble de HMGB1 (*high mobility group box 1*) produite par les LB-LLC induirait la différenciation des NLCs par l'activation des récepteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end-product*) et TLR9 (Jia et al., 2014). L'enzyme NAMPT (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*), sécrétée en forte quantité par les cellules

leucémiques, stimulerait la sécrétion d'IL-6, d'IL-10 et de CCL-3 par les NLC, amplifiant et maintenant leur phénotype M2 (Audrito et al., 2015).

Le profil transcriptomique des NLCs est très proche de celui des TAMs (Ysebaert and Fournié, 2011) correspondant à un phénotype M2d. Les NLCs présentent une production cytokinique et chimiokinique similaire à celle des TAMs, avec une forte sécrétion de TGF $\beta$ , d'IL-10, de CCL17 et CCL22, ainsi qu'une production de VEGF (Bhattacharya et al., 2011a; Giannoni et al., 2014; Ysebaert and Fournié, 2011) et ont des défauts de présentation antigénique, tout en inhibant les mécanismes d'opsonisation (Bhattacharya et al., 2011b).

#### **II.4. Le microenvironnement de la leucémie lymphoïde chronique**

Dans la leucémie lymphoïde chronique, le microenvironnement tumoral joue un rôle particulièrement important. En effet, malgré le fait que les LB-LLC aient des propriétés favorisant leur accumulation (anomalies cytogénétiques, mutations de *TP53*...), ils sont également très dépendants de facteurs de survie et de prolifération extérieurs. En effet, il a été montré que les LB-LLC, bien que résistants à l'apoptose *in vivo* entrent très rapidement et spontanément en apoptose lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* (Collins et al., 1989). Des structures anatomiques particulières, appelées centre de prolifération ou pseudo-follicules, sont observées au sein des organes lymphoïdes secondaires (moelle osseuse et majoritairement dans les ganglions lymphatiques) dans lesquels les LB-LLC expriment plus fortement le Ki-67. Il est estimé que ces centres de prolifération produisent chaque jour 0,1 à 1% de la population totale du clone (Messmer et al., 2005; Ponzoni et al., 2011). Au sein de ces pseudo-follicules, les LB-LLC ont par ailleurs un profil d'expression génique différent du profil des LB-LLC circulants, comprenant une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation du BCR (Herishanu et al., 2011). Le microenvironnement de la LLC active le recrutement des LB-LLC de la circulation sanguine vers les pseudo-follicules des organes lymphoïdes secondaires, la rétention de ces LB-LLC au sein des pseudo-follicules, ainsi que leur survie et prolifération. Ce microenvironnement comprend des lymphocytes T, des cellules NK, des cellules stromales, des cellules myéloïdes suppressives, des cellules folliculaires dendritiques, des cellules endothéliales ainsi que les NLCs, décrites précédemment (Figure 19) (Choi et al., 2016).

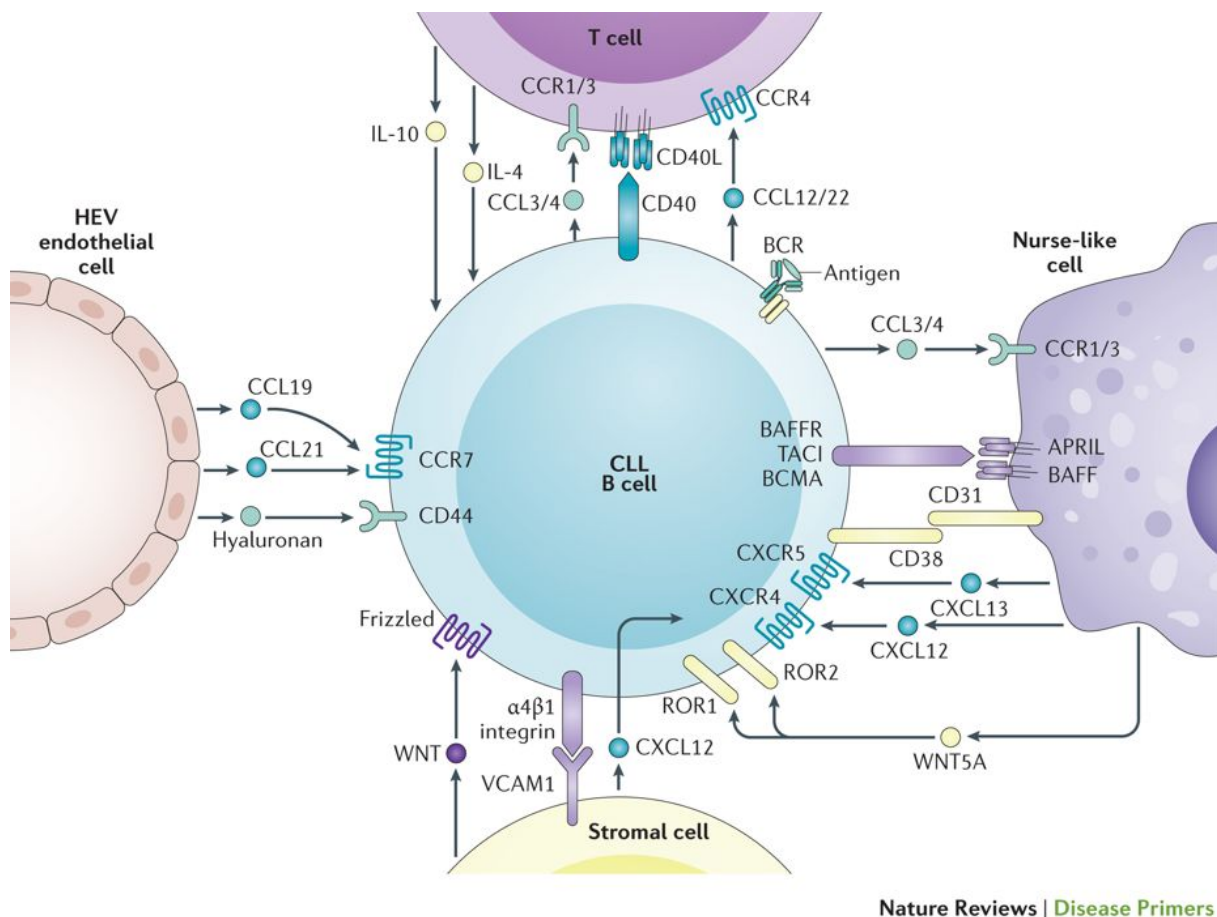


Figure 19 : Le microenvironnement de la leucémie lymphoïde chronique.

Extrait de Kipps et al., 2017

#### II.4.1. Le *homing* des LB-LLC au sein du microenvironnement

Afin d'exercer son rôle pro-tumoral, la première fonction du microenvironnement de la LLC est de recruter les cellules leucémiques au sein des organes lymphoïdes, phénomène qualifié de *homing*. Il dispose pour cela d'un large panel de cytokines et chimiokines qui conditionnent la migration des LB-LLC selon leur gradient de concentration. La première décrite, dont la fonction est majeure, est CXCL12 qui attire les LB. Dans les cas de LLC, CXCL12 est produit en grande quantité par les cellules stromales et les NLCs (Burger et al., 1999). Les cellules B leucémiques expriment fortement CXCR4, le récepteur de CXCL12, dont l'expression est associée à un risque accru d'infiltration des organes lymphoïdes, une augmentation de la stimulation du BCR et est donc de mauvais pronostic pour la pathologie (Calissano et al., 2009a; Coelho et al., 2013). Une fois au contact des NLCs, l'expression de CXCR4 par les LB-LLC chute drastiquement afin de les maintenir au contact des NLC (Messmer et al., 2005). CXCR4 agit en synergie avec le CD38 pour promouvoir le *homing*

(Vaisitti et al., 2010). Les LB-LLC exprimant fortement ZAP-70, CD38 et les intégrines VLA-4 (*very late antigen-4*) migrent de façon plus importante vers CXCL12 (Walsby et al., 2014). Ce potentiel d'attraction de CXCL12 serait dépendant de l'activation des signalisations ERK et STAT3 (Deaglio et al., 2007; Richardson et al., 2006).

Une autre chimiokine, CXCL13, impliquée normalement dans le recrutement et le positionnement des lymphocytes B au niveau des follicules, est produite par les NLCs au cours de la LLC. Les cellules leucémiques expriment fortement CXCR5, récepteur de CXCL13, qui permet la migration des LB-LLC vers les NLCs, par activation des voies PI3K et MAPK, (Ansel et al., 2000; Bürkle et al., 2007; Gunn et al., 1998). Les cellules folliculaires dendritiques expriment également CXCL13 et engagent un *cross-talk* avec les LB-LLC essentiel à leur positionnement au sein des follicules (Heinig et al., 2014).

Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont produites par les cellules stromales et les cellules endothéliales des veinules à endothélium épais, sont importantes pour l'entrée des LB-LLC dans les organes lymphoïdes (Till et al., 2002). CCR7, le récepteur de CCL19 et CCL21, est fortement exprimé par les LB-LLC et de manière plus importante dans les cellules ZAP-70<sup>+</sup> (Richardson et al., 2006).

Les NLCs et la stimulation du BCR favorisent la production, par les LB-LLC, des chimiokines CCL3 et CCL4, qui stimulent le recrutement des LT et des monocytes au sein des pseudo-follicules (Bystry et al., 2001; Krzysiek et al., 1999; Sivina et al., 2011). Les LT peuvent également activer les LB-LLC par le CD40 qu'ils expriment ce qui induit leur activation et leur production de CCL17 et CCL22, qui intensifient le recrutement des LT (Ghia et al., 2002b; Scielzo et al., 2011). Les LT sont par ailleurs connus pour sécréter l'IL-4, impliquée dans la polarisation des NLCs vers le phénotype de macrophages M2. Les cellules leucémiques et celles du microenvironnement permettent ainsi le recrutement et leur activation mutuelle, favorisant le maintien de ce microenvironnement et l'activation de ses autres fonctions.

#### **II.4.2. Support de la survie et de la prolifération des LB-LLC**

Les cellules mésenchymateuses dérivées du stroma médullaire (CSM) peuvent entrer en contact direct avec les LB-LLC, stimulant l'expression de facteurs de survie et de prolifération tels que ZAP-70 et CD38 (Purroy et al., 2015). Elles permettent l'augmentation, dans les LB-LLC, de la glycolyse et de la synthèse de glutathion, favorisant la survie et la résistance aux traitements (Jitschin et al., 2015). Cet effet des CSM sur les LB-LLC requiert

un contact étroit (un phénomène appelé pseudoempéripolèse) qui a été démontré *in vitro*. Ainsi, les LB-LLC migrent spontanément et viennent se loger sous la couche de CSM (Burger et al., 1999). Mais le dialogue entre ces cellules est réciproque, les CSM sont activées par les LB-LLC, par une augmentation de la signalisation PI3K et NF- $\kappa$ B, et par une activation de leur récepteur au PDGF par le PDGF sécrété par les LB, augmentant la sécrétion de VEGF (Ding et al., 2010; Lutzny et al., 2013). Les exosomes issus des cellules leucémiques contiennent également des protéines et des miRNA induisant un phénotype inflammatoire des CSM et ainsi leur prolifération, migration et sécrétion de cytokines inflammatoires, et pourraient ainsi promouvoir la croissance tumorale (Paggetti et al., 2015).

Les LT de LLC montrent une forte production d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et une production normale d'IL-12, qui pourrait protéger les LB-LLC de l'apoptose (Riches et al., 2013). Les lymphocytes T au contact des LB-LLC délivrent des signaux pro-tumoraux par l'activation de CD40L, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 qui augmentent l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Os et al., 2013). Ainsi, des LTh1 spécifiques des LB-LLC augmentent leur survie et prolifération.

De façon complémentaire à son rôle dans le chimiotactisme, CXCL12 a démontré sa fonction dans la survie des LB-LLC. En effet, l'activation de CXCR4, un RCPG, par la fixation de CXCL12, entraîne une activation des voies de signalisation pro-survie ERK et AKT (Nishio et al., 2005). En parallèle de l'action de CXCL12, deux autres facteurs solubles ont une importance majeure dans la stimulation de la survie des LB-LLC, BAFF (*B-cell activating factor*) et APRIL (*A proliferation inducing ligand*).

BAFF et APRIL sont des protéines transmembranaires de type II, membres de la famille du TNF. BAFF peut initier ses effets soit sous sa forme liée à la membrane, soit sous sa forme soluble, et l'interaction avec son récepteur BAFF-R, est connue pour promouvoir la survie et/ou la différenciation des lymphocytes B matures. En plus de BAFF et du récepteur BAFF-R, les LB-LLC expriment également deux autres récepteurs de BAFF, BCMA (*B-cell maturation antigen*) et TACI (*transmembrane interactor and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*), suggérant une action pro-survie autocrine de BAFF dans la LLC. APRIL est majoritairement observé sous forme soluble mais a également été observé lié à la membrane des LB-LLC. APRIL, se fixant sur les récepteurs BCMA et TACI, serait donc également un facteur de survie autocrine dans la LLC (He et al., 2004; Kern et al., 2004; López-Fraga et al., 2001; Mackay and Schneider, 2009; Novak et al., 2002). Au sein du microenvironnement, les NLCs produisent BAFF et APRIL, leur expression étant dépendante

de l'interaction des NLCs avec la MEC (Croci et al., 2013). BAFF et APRIL induisent une activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B et une expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. La signalisation étant différente de celle activée par CXCL12, l'effet induit par ces trois facteurs sur la survie des LB-LLC est additif. Ainsi, l'addition de ces trois facteurs solubles *in vitro* permet la survie de la majorité des LB-LLC mais ne recrée pas l'effet total obtenu en présence des NLCs (Nishio et al., 2005).

D'autres mécanismes sont donc mis en jeu par les NLCs pour stimuler la survie des LB-LLC. Les NLCs et les LB-LLC produisent du HGF et expriment son récepteur c-met, stimulant à la fois le maintien de la polarisation M2 des NLCs et la survie des LB-LLC (Giannoni et al., 2014). De même, les NLCs expriment le CD31, qui peut interagir avec le CD38 des LB-LLC, induisant une surexpression de CD100 (ou sémaphorine 4D) à la surface des LB-LLC. CD100 interagit avec une haute affinité avec la Plexine-B1 exprimée par les NLCs, cette interaction induit un signal pro-survie dans les LB-LLC (Deaglio et al., 2005; Poggi et al., 2010). Des arguments indirects semblent impliquer les NLCs dans l'activation de la voie de signalisation du BCR. En effet, en présence de NLCs, les LB-LLC produisent plus de CCL3 et CCL4, production dépendante de la voie du BCR, mais le mécanisme d'activation du BCR par les NLCs est encore inconnu (Burger et al., 2009).

Une étude a récemment montré que l'effet protecteur des facteurs solubles BAFF, APRIL et CXCL12, nécessitait une interaction physique entre les LB-LLC et les NLCs. Les LB-LLC surexpriment la protéine LFA-3 qui, par interaction avec le CD2, permet la formation d'une synapse immunitaire. Dans le cas des LB normaux, cette synapse est formée par interaction avec le CD2 exprimé par les lymphocytes T, mais dans le cas de la LLC, l'interaction LB-LLC/LT est détériorée, et la synapse se formerait donc avec les NLCs qui expriment aussi le CD2. Une hypothèse a par ailleurs été émise selon laquelle ce contact entraînerait la production des facteurs solubles de survie et était nécessaire à leur effet protecteur (Boissard et al., 2016).

Bien que de façon moins importante, d'autres cellules agissent également sur la survie des LB-LLC. Les cellules endothéliales sont en contact direct avec les LB-LLC *via* les intégrines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 (Maffei et al., 2012), mais également *via* BAFF et APRIL ancrés à leur surface (Cols et al., 2012), ou encore par l'interaction de l'endothéline 1 des LB-LLC avec le sous-type A du récepteur à l'endothéline (Maffei et al., 2014). Cette adhérence des LB-LLC sur les cellules endothéliales entraîne leur activation et leur survie.

La fonction des cellules folliculaires dendritiques intervient également dans la LLC. Ces cellules sécrétant CXCL13 facilitent la migration des LB-LLC exprimant le CXCR5 dans les follicules lymphoïdes (Heinig et al., 2014). De plus, l'adhérence des cellules folliculaires aux LB-CLL *via* le CD44 des LB induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Pedersen et al., 2002) et protège les LB-LLC de l'apoptose par l'interaction également de CD100/PlexinB1 de la même manière que les NLCs (Granziero et al., 2003).

### II.4.3. Microenvironnement et échappement immunitaire

Dans la LLC, les cellules du microenvironnement favorisent l'échappement des cellules leucémiques à l'immunosurveillance anti-tumorale. De plus, le microenvironnement ganglionnaire semble promouvoir l'acquisition de fonctions immunosuppressives par les LB-LLC (Mohr et al., 2016), similaires à celles des B régulateurs (B regs). Ces cellules sont caractérisées par leur production d'IL-10 (Spaner et al., 2006), stimulée par la voie de signalisation impliquant CD5 ainsi que par celle impliquant BAFF et son récepteur TACI (Ferrer et al., 2014; Saulep-Easton et al., 2016). Les LB-LLC régulateurs favorisent l'expansion des Treg et inhibent l'activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. De plus, par leur expression de CD1d et HLA-G, les LB-LLC inhibent l'activité cytotoxique des cellules NKT (*Natural Killer T cells*) et NK (Mohr et al., 2016).

Bien qu'une concentration en cellules NK élevée ait généralement été associée à un meilleur pronostic des LLC en stade précoce et avec un statut *IGHV* muté, avec délai de mise en place du premier traitement plus long (Palmer et al., 2008; Wang et al., 2018), leur fonction est profondément altérée. En effet, les analyses fines des cellules NK montrent des anomalies fonctionnelles, liées à une absence de granules cytolytiques, ce qui induit une altération de leur capacité à lyser efficacement les cellules leucémiques (Kay and Zarlind, 1984). Cette inhibition de la fonction des NK est dépendante des LB-LLC, mais le mécanisme précis reste mal compris, et pourrait passer à la fois par des facteurs solubles et/ou par un contact direct et l'expression d'un CMH de classe 1 non classique, HLA-G (Buechele et al., 2012; Burton et al., 1989; Katrinakis et al., 1996; Maki et al., 2008). Indépendamment de leur taux circulant, le nombre de cellules NK matures diminue au cours de la LLC parallèlement à l'expression de leurs récepteurs activateurs (MacFarlane et al., 2017; Parry et al., 2016) compromettant leur efficacité lors de l'immunothérapie par anti-CD20. Ces cellules immatures ont une viabilité réduite (MacFarlane et al., 2017).

Le nombre de lymphocytes T, particulièrement de LT CD8<sup>+</sup>, augmente dans le sang périphérique des patients LLC, mais ceux-ci montrent également de profondes altérations fonctionnelles. Ces lymphocytes présentent des signes d'activation antigénique chronique, et d'épuisement associé à l'expression des marqueurs CD244 (2B4), CD160 et PD-1 qui correspondent à des récepteurs inhibiteurs (Wherry, 2011). Cet épuisement entraîne un défaut d'activité cytotoxique des LT, liée à l'expression de molécules inhibitrices, principalement de PD-1 (Nunes et al., 2012) et CTLA-4 (Motta et al., 2005). Comme pour les cellules NK, les LT de LLC ont un profil d'expression génique différent des cellules normales et cela étant dépendant des LB-LLC. Les gènes responsables de la polymérisation de la F-actine sont affectés, résultant en un défaut de formation de la synapse immunologique avec les CPA (Ramsay et al., 2008). Au cours de l'évolution de la LLC, le nombre de Tregs augmente et contribue à renforcer l'immunosuppression des LT en exprimant fortement le CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*) et en sécrétant de l'IL-10 (Beyer et al., 2005; Lad et al., 2015; Pallasch et al., 2009). L'activité cytotoxique des LT non conventionnels LTγδ est également diminuée au contact des cellules B leucémiques, cette inhibition est réversible en l'absence de B-CLL (Weerdt et al., 2015).

L'activité des LT est de plus régulée par les NLCs qui jouent également un rôle dans la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale. Elles sécrètent de l'IL-10 et du TGF-β qui favorisent l'expansion des Treg. L'association des facteurs solubles immunosuppresseurs IL-10 et IDO produits par les NLCs et des Treg permet d'inhiber le développement et l'activation des populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Giannoni et al., 2014; Ysebaert and Fournié, 2011). L'enzyme NAMPT, surexprimée dans les cas de LLC, permet quant à elle d'activer les signalisations par ERK, STAT3 et NF-κB, favorisant la survie des LB-LLC, tandis qu'elle entraîne une surexpression de PD-1 par les NLCs, inhibant l'activité des LT (Audrito et al., 2015). De plus, l'expression dans les NLCs des gènes *FGGR2B*, *LYZ*, *HLA-DRA* et *CD74*, indique une incapacité des NLCs à correctement traiter et présenter les antigènes, et activer la réponse immunitaire (Bhattacharya et al., 2011b).

Découvertes plus récemment, les cellules myéloïdes suppressives sont induites par les LB-LLC, et activent la suppression des cellules T et NK par une activité enzymatique IDO accrue et par l'augmentation des lymphocytes T Reg (Jitschin et al., 2014).



#### **II.4.4. Microenvironnement et résistance thérapeutique**

En plus de ses rôles de recrutement des LB-LLC et de promotion de leur survie et prolifération, le microenvironnement est également impliqué dans les résistances thérapeutiques.

Ceci a été montré à plusieurs niveaux. Le contact entre les LB-LLC et les cellules endothéliales permet une résistance des LB-LLC aux drogues (Maffei et al., 2014). Les cellules stromales induisent une diminution de l'expression du CD20 à la surface des LB-LLC, atténuant l'effet des thérapies anti-CD20 (Marquez et al., 2015). Elles induisent également la glycolyse suite à l'activation de c-Myc par la voie NOTCH, stimulant la survie des LB-LLC et leur résistance aux traitements (Jitschin et al., 2015). L'activité cytolytique des cellules NK est réduite, compromettant la lyse des LB-CLL par le rituximab (Reiners et al., 2013).

L'implication des NLCs a été démontrée dans les mécanismes de résistance thérapeutique des LB-LLC. La première étude concernait la fludarabine, la dexaméthasone et le chlorambucil. Elle n'a pas montré l'impact des NLCs sur la résistance à la fludarabine qui induisait l'apoptose des LB-LLC (en présence ou en absence des NLCs) ainsi que l'élimination des NLCs. En revanche, les traitements à la dexaméthasone et au chlorambucil n'entraînent pas l'apoptose des NLCs, qui protègent partiellement les LB-LLC contre l'apoptose selon un mécanisme dépendant de CXCL12 (Filip et al., 2015).

Les NLCs ont démontré un effet protecteur contre le traitement à l'ibrutinib, l'une des thérapies les plus courantes à ce jour. En présence des NLCs, l'apoptose des LB-LLC induite par l'ibrutinib est partiellement inhibée (Boissard et al., 2015a). Cet effet passe par une modulation de la fonction des NLCs par l'ibrutinib. Cette molécule induit une diminution des capacités de phagocytose et une accentuation du phénotype immunosuppresseur des NLCs, tout en augmentant la polarisation M2 par la signalisation IL-4. L'effet inhibiteur de l'apoptose dépend quant à lui de l'augmentation de la production d'IL-10 par les NLCs (Fiorcari et al., 2016). La combinaison d'ibrutinib avec de la bendamustine ou du venetoclax semblerait cependant abolir cet effet protecteur des NLCs (Boissard et al., 2015a).

#### II.4.5. Le microenvironnement comme cible thérapeutique

Compte tenu de la forte dépendance des LB-LLC à leur microenvironnement pour supporter leur survie, cibler cette interaction est une perspective thérapeutique prometteuse. Malgré les résistances discutées précédemment, les inhibiteurs de la voie de signalisation du BCR, ibrutinib et idelalisib ont prouvé leur efficacité pour inhiber cette interaction (Byrd et al., 2013).

Le lenalidomide inhibe l'action du microenvironnement et module les profils d'expression cytokiniques de celui-ci (Chanan-Khan and Porter, 2006). Il permet de surpasser l'effet protecteur des NLCs, qui présentent une expression accrue d'IL-10 et des défauts d'initiation du chimiotactisme (Schulz et al., 2013). Il réactive la prolifération les activités anti-tumorales des LT CD4<sup>+</sup> et des NK (Acebes-Huerta et al., 2014; Aue et al., 2009; Lee et al., 2011; Wu et al., 2008). Les fonctions de formation de la synapse immunitaire et de migration des LT sont rétablies, l'axe immunosuppresseur PD-1/PD-L1 est inhibé, de même que la prolifération des Treg (Galustian et al., 2009; Ramsay et al., 2008, 2013; Schulz et al., 2013). Le lenalidomide est utilisé en combinaison avec du rituximab, et son association avec de l'ibrutinib a été évaluée (James et al., 2014; Pollyea et al., 2014). Les données préliminaires ont montré la survenue de neutropénie profonde et que l'efficacité de l'association n'était pas supérieure à celles de l'association rituximab-lenalidomide ou l'ibrutinib seul. Compte tenu de ces résultats et de la neutropénie soutenue, cet essai de phase 1 n'a pas été poursuivi (Ujjani et al., 2018).

Une autre perspective serait d'inhiber la signalisation induite par les chimiokines. La cible privilégiée est le couple CXCL12/CXCR4. Plusieurs anticorps (Ulocuplumab) et antagonistes (Plerixafor) bloquant le CXCR4 ont été développés. L'ulocuplumab est en cours d'essai clinique, en association avec du rituximab et de la bendamustine. Cette association a montré une diminution de l'expression de CXCR4 et de la mobilisation des LB-LLC avec une diminution de la lymphadénopathie (Kashyap et al., 2016). Le plerixafor inhibe l'activation des LB-LLC par le CXCL12, le chimiotactisme, et les interactions avec les cellules stromales et les NLCs (Stamatopoulos et al., 2012). Un oligonucléotide d'ARN, le NOX-A12, inhibe la migration en ciblant CXCL12, sensibilise les cellules leucémiques aux agents cytotoxiques (Hoellenriegel et al., 2014) et est actuellement en cours d'essai clinique en combinaison avec le rituximab et la bendamustine (Steurer et al., 2014).

Une stratégie plus récente consiste à cibler la mise en place du microenvironnement, et notamment la différenciation des NLCs. Dans cette optique, des inhibiteurs du récepteur au

CSF-1, le CSF-1R, ont été développés. Deux inhibiteurs de CSF-1R, GW-2580 et ARRY-382, permettent une inhibition de l'apparition et de la viabilité des NLCs et donc une diminution de la viabilité des LB-LLC. Ces molécules agissent en synergie avec l'ibrutinib et l'idelalisib (Edwards V et al., 2018; Polk et al., 2016; Sweeney et al., 2015). Leur utilisation en combinaison avec les traitements actuels semble ainsi être une stratégie prometteuse pour cibler à la fois les cellules leucémiques et leur microenvironnement.

Enfin, des inhibiteurs de checkpoint immunitaires, notamment le pembrolizumab, inhibiteur de PD-1, permettraient d'éviter l'épuisement des LT, de restaurer la formation de la synapse immunitaire et leur cytotoxicité, et donc inhiber le développement de la LLC (McClanahan et al., 2015). Cette efficacité a notamment été montrée dans les formes évolutives accompagnées d'une transformation en syndrome de Richter (Ding et al., 2017).

Outre ces différents facteurs immunitaires agissant sur la régulation des NLCs et des LB leucémiques, d'autres facteurs de croissance tels que les neurotrophines et la neurotensine agissent sur les lymphocytes B et leur implication dans la LLC nécessite d'être explorée. Le chapitre suivant décrit ces différents facteurs de croissance et leurs récepteurs ainsi que leurs fonctions dans le système immunitaire.

## Chapitre III. Les neurotrophines, la neurotensine et leurs récepteurs

---

### III.1. Les neurotrophines et leurs récepteurs

#### III.1.1. Les neurotrophines

Les neurotrophines (NTs) constituent une famille de facteurs de croissance, découverte à partir des années 50, et impliquée dans les processus de développement du système nerveux, la régulation de la survie et de l'apoptose, ainsi que la différenciation et la prolifération des cellules neuronales. Cette famille est constituée de quatre membres, le premier à avoir été identifié est le NGF (Cohen et al., 1954), suivi du BDNF (Barde et al., 1982), de NT-3 (Maisonpierre et al., 1990) et de NT-4/5 (Hallböök et al., 1991).

Les neurotrophines NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5 sont codés par des gènes codant des formes précurseurs des NTs, appelées pré-pro-NTs, acheminées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où débute leur processus de maturation. Au sein du RE, le peptide signal est clivé pour donner une forme pro-NT, de 30 à 35 kDa. Les pro-NTs subissent un clivage afin d'obtenir les NTs matures. Ce clivage peut avoir lieu en intracellulaire par l'action de protéases telles que la furine, les NTs étant alors sécrétées sous forme mature. Les pro-NTs peuvent également être sécrétées sous cette forme puis clivées par des protéases extracellulaires telles que les métalloprotéases MMP-3 et MMP-7 ou la plasmine (Pang et al., 2004). Les NTs matures, de 13 à 15 kDa, s'homodimérisent par liaison non covalente. Les NTs matures et les pro-NTs sont toutes deux des formes actives qui se lient à des récepteurs membranaires de haute affinité, les récepteurs Trk pour les NTs matures et le récepteur p75<sup>NTR</sup> pour les pro-NTs (Chao and Bothwell, 2002; Lee et al., 2001; Lessmann and Brigadski, 2009; Lessmann et al., 2003).

#### III.1.2. Les récepteurs des neurotrophines

##### III.1.2.1. Les récepteurs Trks

Les récepteurs Trk sont au nombre de trois, TrkA, TrkB et TrkC, codés respectivement par les gènes *NTRK1* (*Neurotrophin Receptor Kinase 1*), *NTRK2* et *NTRK3*. Chacun de ces récepteurs a une haute affinité pour une NT mature, ainsi TrkA est le récepteur de haute affinité pour le NGF (Klein et al., 1991a), TrkB celui du BDNF et de NT-4/5 (Klein et al., 1991b) et TrkC celui de NT-3 (Lamballe et al., 1991). NT-3 peut également interagir avec TrkA et TrkB mais avec moins d'affinité (Arévalo and Wu, 2006) (Figure 20).

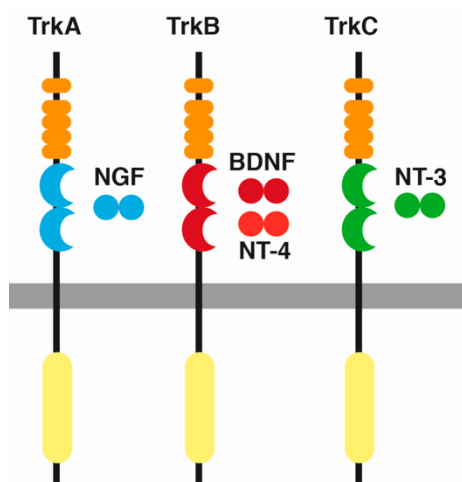


Figure 20 : Interaction des neurotrophines avec les récepteurs Trk.  
Extrait de Sánchez-Sánchez et al., 2017

### III.1.2.2. Structures des Trks

Les Trks sont des récepteurs transmembranaires de type 1 de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK). Chaque récepteur est constitué d'environ 800 acides aminés et a une masse moléculaire moléculaire de 145 kDa, les trois récepteurs ayant environ 50% d'homologie peptidique (Brodeur et al., 2009a).

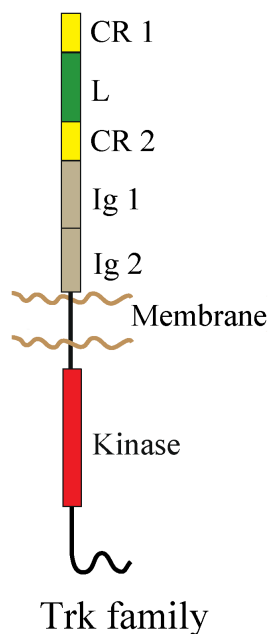


Figure 21 : Structure des récepteurs Trk.  
Extrait de Maruyama and Maruyama, 2014

Les récepteur Trks sont constitués de trois domaines. Un domaine extracellulaire, composé d'environ 400 acides aminés au sein desquels est située une région riche en leucine, flanquée de deux régions riches en cystéines (C1 et C2) puis de deux domaines de type Ig-C2 qui permettent la liaison du ligand spécifique tout en empêchant la dimérisation spontanée du récepteur en absence de ce ligand (Uren and Turnley, 2014). La partie extracellulaire des Trks est par ailleurs fortement glycosylée, contrôlant leur localisation et l'activation de leur signalisation (Watson et al., 1999).

Le domaine transmembranaire des Trks permet leur ancrage à la membrane et est composé d'une hélice  $\alpha$ . La partie intracellulaire permet l'activation de la signalisation de Trks. Elle est composée d'un domaine tyrosine kinase très conservé entre les différents récepteurs. Ce domaine est caractérisé par la présence de trois tyrosines ayant la capacité de se trans-autophosphoryler lors de la dimérisation des récepteurs à la suite de leur liaison au ligand. Deux autres tyrosines sont impliquées dans le recrutement des protéines de signalisation, une dans la partie N-terminale du domaine permet le recrutement des protéines Shc (*Src homology-2 domain-containing protein*) et une seconde en C-terminal permet le recrutement de la phospholipase C $\gamma$  (Uren and Turnley, 2014).

Il existe plusieurs isoformes des récepteurs TrkA, TrkB et TrkC, issues d'un épissage alternatif au cours de la transcription de leurs gènes respectifs. Ces isoformes ont des fonctions biologiques variables et différentes des fonctions classiques des formes totales, résumées dans la Figure 22.

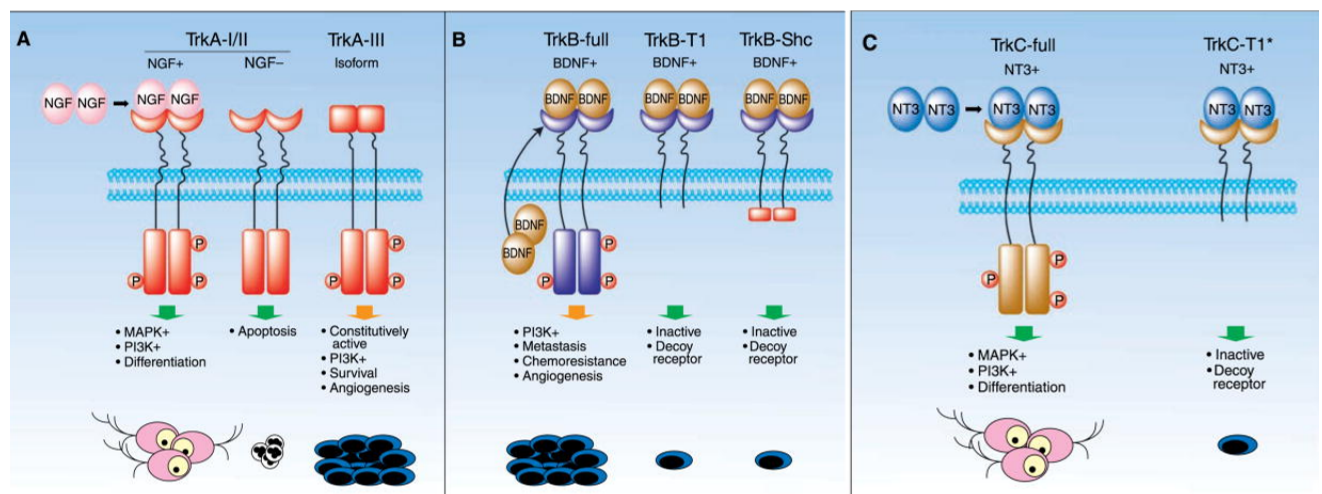


Figure 22 : Isoformes des récepteurs Trks.

Extrait de Brodeur et al., 2009b

### III.1.2.3. Voies de signalisation

Suite à la liaison de leur ligand, les récepteur Trks s'homodimérisent et trans-autophosphorylent les tyrosines du domaine kinase. La phosphorylation de ces tyrosines entraîne le recrutement des protéines adaptatrices telles que Shc par Y490, PLC- $\gamma$  par Y785 ou Grb2 et SH2B par Y670, Y674 et Y695, activant les voies de signalisation MAPK, PI3K et PLC- $\gamma$ /PKC (Huang and Reichardt, 2003). Ces voies de signalisation (Figure 23) jouent un rôle prépondérant dans la croissance, la survie et la différenciation neuronale, mais également dans le développement de différents types de tumeurs, notamment bronchiques, colorectales, neuroblastiques ou encore lymphoïdes (Arévalo and Wu, 2006; Brodeur et al., 2009a; Hillis et al., 2016).

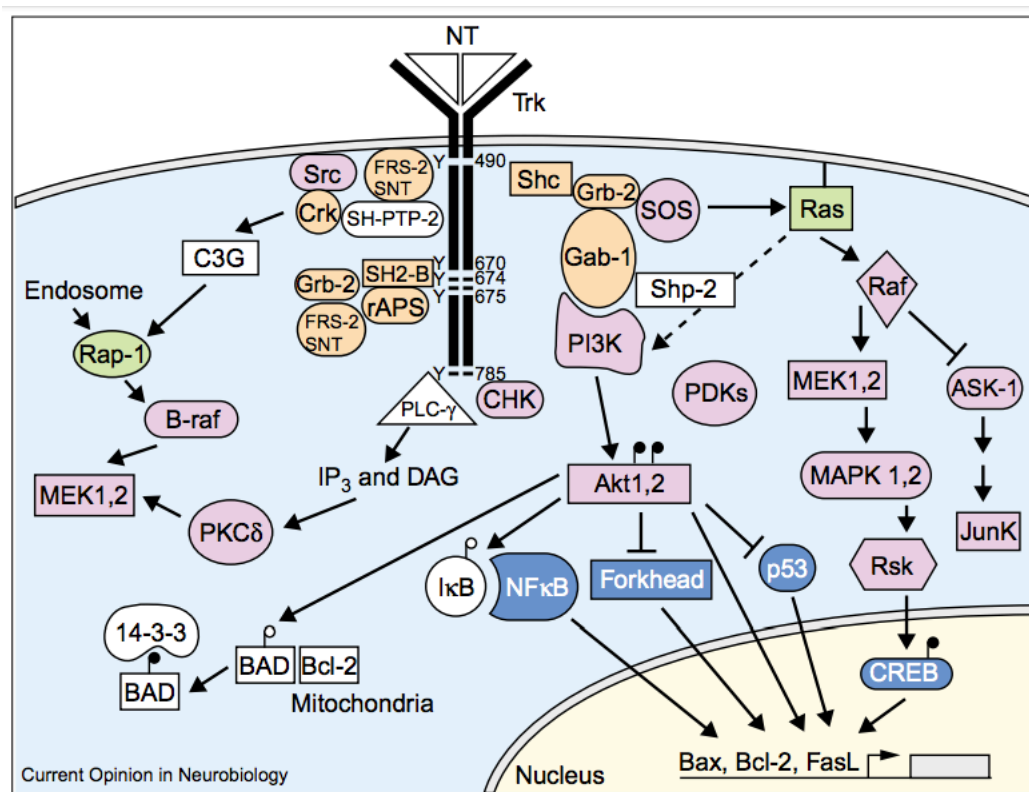


Figure 23 : Les voies de signalisation activées par les récepteurs Trks.

Extrait de Patapoutian and Reichardt, 2001

Le recrutement de Shc par une tyrosine phosphorylée de Trk permet le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2, interagissant elle-même avec la protéine SOS (Son of Sevenless) et des facteurs d'échange de guanines entraînant l'activation de la protéine Ras (*Ras GTPase activating protein*). L'activation de Ras déclenche la phosphorylation et l'activation en cascade de Raf (*Raf kinase*), MEK1/2 puis ERK1/2, induisant au final l'activation de facteurs de transcription tels que CREB (*cAMP Response Element Binding*) ou Elk-1 (*ETS domain-*

*containing protein Elk-1*) qui régulent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Moodie and Wolfman, 1994; Reichardt, 2006; Thomas et al., 1992; Uren and Turnley, 2014). L'arrêt du signal est induit par les MAPKs elles-mêmes qui entraînent la dissociation du complexe Grb2-SOS (Kao et al., 2001). Une seconde voie d'activation de la voies des MAPKs passe par les Trks qui recrutent des adaptateurs Crk activant les GTAases Rap-1 et B-Raf (Wu et al., 2001; York et al., 1998).

La voie PI3K/Akt est également activée par les NTs. Cette activation peut se faire de façon Ras dépendante (Vaillant et al., 1999) ou par le recrutement de la protéine Gab1 (*Grb2-associated-binding protein-1*), activant PI3K (Holgado-Madruga et al., 1997). PI3K induit le recrutement de Akt et de PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*), cette dernière activant Akt. Akt active les facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B, régulateur important des mécanismes de survie, et forkhead, régulateur de l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que FasL (Brunet et al., 1999). Akt phosphoryle également la protéine pro-apoptotique BAD, inhibant son action (Datta et al., 1997).

Enfin la phosphorylation des Trks permet le recrutement de la PLC- $\gamma$ , qui génère du diacylglycerol (DAG) et de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>), induisant le relargage du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'activation de la PKC puis de ERK par l'intermédiaire de Raf (Corbit et al., 1999). Une seconde voie d'activation de la PKC passerait par le recrutement de la protéine Src, par la protéine adaptatrice FRS-2 (Wooten et al., 2001).

Les récepteurs Trks peuvent interagir avec la sortiline (protéine présentée plus en détail dans le Chapitre III.2.2.3.) (Vaegter et al., 2011). La sortiline permettrait le transport antérograde des récepteurs Trks vers la membrane plasmique, ainsi que la fixation des pro-NTs, à la fois sur les récepteurs Trks et la sortiline, pour activer les voies de signalisation PI3K/Akt et Src (Demont et al., 2012).

### **III.1.3. Le récepteur p75<sup>NTR</sup>**

Le récepteur p75<sup>NTR</sup>, également appelé NGFR (*NGF Receptor*) est un récepteur de faible affinité pour toutes les NTs matures et de haute affinité pour les pro-NTs (Herrup and Shooter, 1973; Rodríguez-Tébar et al., 1992). P75<sup>NTR</sup> est un récepteur glycosylé transmembranaire de type 1, présentant des caractéristiques de la famille des récepteurs du TNF, de 399 acides aminés. Il est constitué d'un domaine extracellulaire présentant quatre domaines riches en cystéine possédant des ponts disulfures lui conférant une conformation spécifique et la capacité de lier les ligands à chaque domaine (Yan and Chao, 1991). Des sites



de O- et N-glycosylations, impliqués dans les mécanismes d'adressage du récepteur à la membrane, sont présents sur le domaine extracellulaire (Breuzza et al., 2002). La partie transmembranaire est constituée d'une hélice  $\alpha$  et de la cystéine C257 permet la dimérisation du récepteur en formant un pont disulfure entre deux monomères de  $p75^{\text{NTR}}$  (Nadezhdin et al., 2016). La partie intra-cytoplasmique de  $p75^{\text{NTR}}$  présente un domaine de mort ou *Death Domain* (DD) constitué de six hélices  $\alpha$  permettant de recruter des protéines adaptatrices activant la voie des caspases et la mort des cellules par apoptose (Roux and Barker, 2002). Un domaine *Chopper* est également présent, et assure la liaison des protéines TRAF4 et TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factors*) (Khursigara et al., 1999; Krajewska et al., 1998), ainsi qu'un motif Sérine-Proline-Valine qui interagit avec des protéines adaptatrices à domaines PDZ (*Post-synaptic Disc-large Zona*) (Sheng and Sala, 2001). Cette partie intracytoplasmique permet donc le recrutement de nombreuses protéines adaptatrices pour former des plateformes de signalisation intracellulaire.

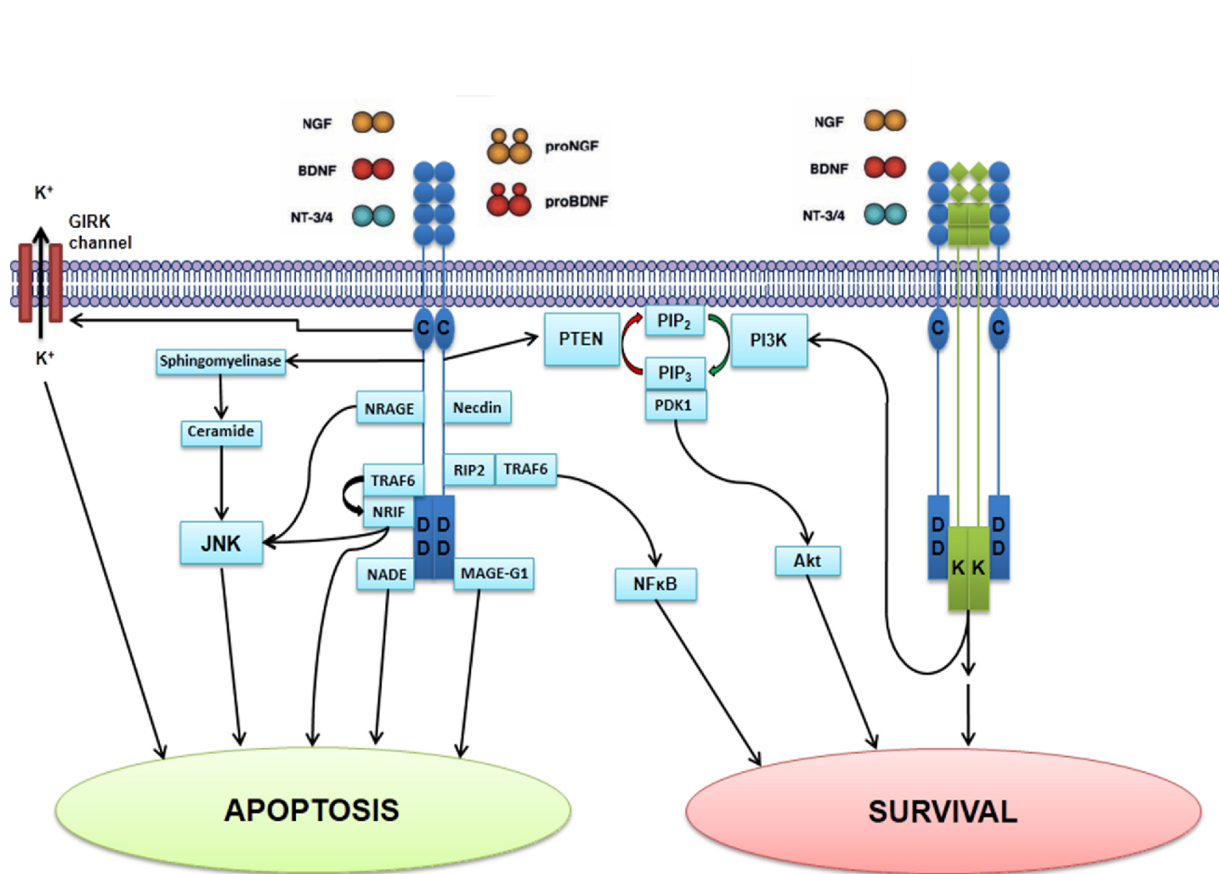


Figure 24 : Signalisation par  $p75^{\text{NTR}}$ .

Adapté de Kraemer et al., 2014

Selon ses ligands, ses co-récepteurs et les protéines adaptatrices recrutées, le récepteur p75<sup>NTR</sup> peut engager diverses voies de signalisation, soit pro-survie soit pro-apoptotiques (Figure 24).

- La signalisation pro-apoptotique : Les protéines adaptatrices NRIF (*NT-receptor interacting factor*), NRAGE (*NT-receptor interacting MAGE homolog*), TRAF ou encore NADE (*NT-associated cell death receptor*) sont recrutées au niveau du DD ou du domaine *Chopper*. Ces protéines activent la GTPase Rac qui déclenche une cascade de phosphorylation pour activer la MAPK JNK (*Jun kinase*) qui entraîne l'apoptose par activation des facteurs de transcription p53 et c-Jun ainsi que des protéines pro-apoptotiques Bim, Bad et Bax, puis la voie des caspases (Nykjaer et al., 2005; Roux and Barker, 2002; Yeiser et al., 2004). Cette signalisation pro-apoptotique est déclenchée par les pro-NTs, dont l'affinité de liaison pour p75<sup>NTR</sup> dépend de l'interaction de p75<sup>NTR</sup> avec la sortiline qui en constitue le co-récepteur. En effet, l'interaction de p75<sup>NTR</sup> avec la sortiline est nécessaire pour la liaison du pro-NGF qui induit une signalisation pro-apoptotique *via* JNK (Jansen et al., 2007; Nykjaer and Willnow, 2012a; Nykjaer et al., 2004, 2005). Le pro-BDNF et la pro-NT-3 déclenchent également cette signalisation en interagissant avec le complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline (Teng et al., 2005; Yano et al., 2009).
- La signalisation pro-survie : Bien qu'avec une affinité moindre, p75<sup>NTR</sup> peut également lier les NTs matures et déclencher une signalisation pro-survie. La liaison du NGF, du BDNF et de NT-3 active la voie PI3K/Akt (Roux et al., 2001), tandis que le NGF peut aussi activer la voie NF- $\kappa$ B par le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF6, qui active la PKC $\zeta$  (Wooten et al., 2001), ou RIP-2 (*Receptor Interacting Protein 2*) (Khursigara et al., 2001). De plus, l'interaction de p75<sup>NTR</sup> avec les récepteurs TrkA, TrkB et TrkC, ce qui augmente leur affinité de liaison pour leurs NTs matures respectives et ainsi la signalisation pro-survie associée (Dechant, 2001; Eggert et al., 2000; Hantzopoulos et al., 1994; Hempstead et al., 1991).

#### III.1.4. Les neurotrophines dans les lymphocytes B

L'expression et la sécrétion des NTs a été observée dans les cellules immunitaires, à la fois dans les organes lymphoïdes et dans la circulation. Les NTs ont un effet sur de nombreuses cellules immunitaires (Vega et al., 2003). Les macrophages sécrètent le NGF, le BDNF et NT-4/5, et les LT produisent du NGF. Le récepteur p75<sup>NTR</sup> est exprimé par les LT et

les cellules dendritiques, tandis que TrkA est exprimé par les cellules dendritiques et les monocytes. Le NGF a une large action sur les cellules immunitaires en stimulant notamment la survie, l'activation et la différenciation des LT, LB, monocytes, éosinophiles, neutrophiles, basophiles et mastocytes (Besser and Wank, 1999; Boven et al., 1999; Ehrhard et al., 1993; Labouyrie et al., 1997, 1999; Lambiase et al., 1997; Schober et al., 1998). Concernant les LB, les NTs et leurs récepteurs sont impliqués dans la survie, la prolifération, la différenciation et la sécrétion d'anticorps. L'expression et le rôle des NTs et de leurs récepteurs dans les LB normaux est résumé dans le Tableau 7 (Hillis et al., 2016).

Protéine	Expression	Rôle
<b>NGF</b>	Dans les LB humains activés et quiescents (Torcia et al., 1996)	Prolifération des lignées de B mémoires-like CESS et des LB humains <i>in vitro</i> (Otten et al., 1989; Rosini et al., 2000)
		Survie des lignées de B mémoires-like CESS et des LB mémoires humains <i>in vitro</i> (Rosini et al., 2000; Torcia et al., 1996)
	Expression supérieure dans les B mémoires (Torcia et al., 1996) et la lignée cellulaire B mémoire-like CESS (Rosini et al., 2000)	Différenciation et production d'IgM par les LB <i>in vitro</i> (Kimata et al., 1991; Torcia et al., 1996)
		Expression du récepteur de l'IL-2 par les LB activés <i>in vitro</i> (Brodie and Gelfand, 1992)
		Production d'IgG et d'IgA par les LB humains quiescents et activés <i>in vitro</i> (Kimata et al., 1991)
		Expression du CD40 par les LB <i>in vitro</i> (Brodie and Gelfand, 1992)
		Inhibition de la production d'IgE par les LB <i>in vitro</i> (Brodie et al., 1996)
<b>BDNF</b>	Dans les LB humains activés (Torcia et al., 1996)	Maturation des pré-B murins en LB matures dans la moelle osseuse (Schuhmann et al., 2005)
	Dans les lignées de LB (Fauchais et al., 2008)	Survie des LB déprivés de sérum <i>in vitro</i> (Fauchais et al., 2008)
		Induction de l'apoptose de la lignée BL-2 (LB matures) <i>in vitro</i> par le pro-BDNF (Fauchais et al., 2008)
<b>NT-3</b>	Dans les LB humains activés (Torcia et al., 1996)	Inconnu
<b>NT-4/5</b>	Inconnu	Inconnu
<b>TrkA</b>	Dans les LB humains activés et quiescents (Torcia et al., 1996)	Inconnu
<b>TrkB-FL</b>	Dans les lignées de LB (Klein, 1994)	Inconnu
<b>TrkB-T1</b>	Dans les lignées de LB activées (Torcia et al., 1996) et les splénocytes et les cellules de la moelle	Maturation des pré-B murins en LB matures dans la moelle osseuse (Schuhmann et al., 2005)

	osseuse de souris (Schuhmann et al., 2005)	
<b>TrkC</b>	Inconnu	Inconnu
<b>P75<sup>NTR</sup></b>	Dans les splénocytes et les cellules de la moelle osseuse de souris (Schuhmann et al., 2005), les LB humains activés et quiescents (Torcia et al., 1996), et les lignées cellulaire B mémoires-like (Rosini et al., 2000)	Induction de l'apoptose de la lignée BL-2 (LB matures) <i>in vitro</i> par le pro-BDNF (Fauchais et al., 2008)
<b>Sortiline</b>	Dans les lignées de LB (Fauchais et al., 2008)	Induction de l'apoptose de la lignée BL20 (LB matures) (Fauchais et al., 2008)

Tableau 7: Expression et implication des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les lymphocytes B.  
D'après Hillis et al., 2016

### III.1.4.1. Dans les hémopathies malignes B

Les neurotrophines ont été incriminées pour leur implications dans le développement de nombreux cancers, notamment de neuroblastomes et glioblastomes, de cancers du poumon, du sein, du colon, du pancréas et de la prostate, mais également dans les tumeurs lymphoïdes (Meldolesi, 2018). Les hémopathies malignes B dans lesquelles les NTs sont impliquées comprennent les leucémies aigües lymphoblastiques et myéloïdes, le DLBCL (lymphome diffus à grandes cellules B), le myélome multiple, ainsi que le lymphome de Burkitt (Hillis et al., 2016). Bien que dans les LB normaux ce soit le NGF qui semble être la NT ayant le rôle le plus important, il semblerait en revanche que dans les cas d'hémopathie malignes B, ce soit le BDNF et son récepteur TrkB qui auraient un rôle prépondérant sur la survie des LB tumoraux et leur résistance aux thérapies (Hillis et al., 2016).

Dans les cas de leucémies aigües lymphoblastiques, 22 à 38% des patients expriment le récepteur p75<sup>NTR</sup> (Beutel et al., 2005). Dans la lignée pré-B Nalm6, une faible expression membranaire de la sortiline a été mise en évidence. Celle-ci augmente lorsque les cellules sont en conditions de stress et aurait pour rôle de protéger les cellules de la mort (Saada et al., 2012). Les cellules tumorales de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe exprimeraient quant à elles toutes les NTs et leurs récepteurs, et notamment le BDNF et TrkB. Dans un modèle de souris leucémique, le BDNF et TrkB permettent l'activation et la leucémogénèse des cellules hématopoïétiques, favorisent la survie des cellules tumorales, ainsi que leur résistance à la radiothérapie (Li et al., 2009).

Les lignées cellulaires issues de DLBCL expriment les récepteurs p75<sup>NTR</sup> et TrkB sous sa forme tronquée TrkB-T1 (Bellanger et al., 2011) et totale (Dubanet et al., 2015), ainsi que la sortiline, et sécrètent du BDNF mature (Bellanger et al., 2011; Sniderhan et al., 2009). La voie PI3K/Akt est constitutivement activée dans ces cellules. Par ailleurs, p75<sup>NTR</sup> est associé à TrkB et non à son co-récepteur de mort, suggérant une implication de TrkB/BDNF/p75<sup>NTR</sup> dans la signalisation pro-survie de ces cellules. De plus, en conditions de stress cellulaire, l'expression de TrkB et p75<sup>NTR</sup> est augmentée, avec une relocalisation de TrkB à la membrane cellulaire, accentuant sa signalisation pro-survie et induisant potentiellement des résistances thérapeutiques (Bellanger et al., 2011). L'inhibition des récepteurs Trks avec l'inhibiteur K252a entraîne l'apoptose de ces cellules et améliore l'effet cytotoxique du rituximab utilisé classiquement dans le traitement de ce lymphome (Dubanet et al., 2015).

Dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, l'expression de BDNF/TrkB est associée à la survie et la prolifération des cellules, et aux résistances thérapeutiques. L'inhibition du BDNF entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une activation des voies apoptotiques par diminution de Bcl-2, augmentation de Bax et activation des caspases, ainsi qu'une meilleure réponse aux traitements au 5-FU (Xia et al., 2014). Dans des conditions de stress, l'expression de la sortiline est relocalisée du cytoplasme vers la membrane plasmique, indiquant sa possible implication dans la signalisation de survie (Saada et al., 2012).

La sécrétion de BDNF et l'expression de son récepteur TrkB ont également été observées dans des lignées cellulaires de myélome multiple, où ils activent de façon autocrine les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt, favorisant la survie et la résistance aux traitements (Pearse et al., 2005). Les cellules de myélome multiple expriment également la sortiline, qui serait nécessaire à la sécrétion du BDNF mature et contribuerait donc à la signalisation autocrine pro-survie. Il a cependant été identifié dans ce même modèle que la sortiline interagit également avec p75<sup>NTR</sup> et le pro-BDNF, induisant alors la mort des cellules par apoptose. La sortiline aurait donc deux rôles distincts, pro et anti-apoptotique selon ses partenaires, et dont la balance pourrait contribuer au développement de ces hémopathies malignes (Fauchais et al., 2008; Saada et al., 2012).

## III.2. La neurotensine et ses récepteurs

### III.2.1. La neurotensine

La neurotensine (NTS) a été découverte en 1973 dans des extraits hypothalamiques bovins (Carraway and Leeman, 1973). Il s'agit d'un tridécapéptide de séquence pGlu–Leu–Tyr–Glu–Asn–Lys–Pro–Arg–Arg–Pro–Tyr–Ile–Leu–COOH (Carraway and Leeman, 1975). Le gène *NTS*, localisé sur le chromosome 12, code pour deux protéines, la NTS et la neuromédine N (NMN) (Marondel et al., 1996). La protéine synthétisée, la pro-NTS, de 120 acides aminés, subit des clivages par des prohormones convertases pour donner la NTS et la NMN matures (Figure 25). La NTS et la NMN sont produites de manière différentielle selon les tissus et les conditions physiologiques (Kislauskis et al., 1988), ainsi que selon l'expression des différentes prohormones convertases exprimées (Kitabgi, 2006).

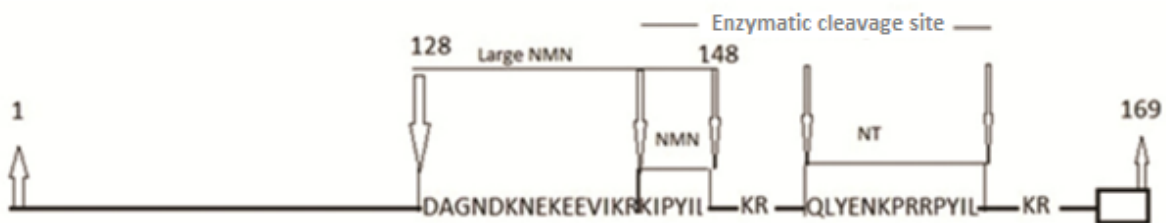


Figure 25 : Clivage de la pro-NTS en Neurotensine et Neuromédine N.

Extrait de Mitra, 2017

L'activité biologique de la NTS dépend de sa partie C-terminale (acides aminés 8-13) (Rostène and Alexander, 1997), qui est clivée par des endopeptidases et des carboxypeptidases pour induire l'inactivation et la dégradation de la NTS (Almenoff et al., 1981; Checler et al., 1986).

La NTS est exprimée dans les systèmes nerveux central (SNC) et périphérique ainsi que dans certains organes périphériques. Au sein du SNC, la NTS a un rôle de neurotransmetteur et de neuromodulateur. Son niveau d'expression varie selon les régions cérébrales, avec une expression maximale dans l'hypothalamus (Cooper et al., 1981). La NTS est exprimée dans les corps cellulaires et les terminaisons nerveuses des neurones (Dobner, 2005). Au sein du SNC, la NTS module un large panel d'effets selon les régions cérébrales. Ainsi il a été montré que la NTS peut réguler la perception de la douleur, le système cardiovasculaire, la prise alimentaire, la libération d'hormones hypophysaires, la pression artérielle

ou encore l'inflammation (Dobner, 2005, 2006; Kleczkowska and Lipkowski, 2013; Mitra, 2017). La NTS est également impliquée dans les pathologies neurodégénératives de Huntington et Parkinson (Mustain et al., 2011). Elle module également l'activité d'autres neurotransmetteurs, notamment dopaminergiques (Fuxe et al., 1992) mais aussi sérotoninergiques, cholinergiques, glutamatergiques et GABAergiques (Boules et al., 2013; Mustain et al., 2011).

En périphérie, la NTS est principalement détectée dans le tractus gastro-intestinal et le système cardiovasculaire (Carraway and Leeman, 1976). Dans le tractus gastro-intestinal, la NTS est produite par les neurones périphériques innervant les muscles lisses, mais également par les cellules des muqueuses du tractus gastro-intestinal (Hammer et al., 1982). La NTS peut y agir comme hormone locale, contrôlant la motilité intestinale, l'hypotension, les sécrétions d'acide gastrique et la digestion lipidique, ainsi que comme un facteur de croissance régulant la prolifération des cellules normales et tumorales (Carraway and Plona, 2006; Mitra, 2017; Vincent et al., 1999). La NTS périphérique a également une action sur la production d'hormones hypophysaires (Rostène and Alexander, 1997) ainsi que sur l'apparition de maladies cardio-vasculaires, diabète et/ou obésité (Li et al., 2016).

### **III.2.2. Les récepteurs de la neurotensine**

La NTS possède trois récepteurs, le RCPG de haute affinité NTSR1 (*Neurotensin Receptor 1*), le RCPG de faible affinité NTSR2 et la sortiline, un récepteur de la famille des protéines à domain Vps10 (*Vacuolar Protein Sorting 10*).

#### **III.2.2.1. Le récepteur de la neurotensine de type 1 (NTSR1)**

Le gène *NTSR1* est localisé sur le chromosome 20 et code une protéine de 418 acides aminés (Laurent et al., 1994; Tanaka et al., 1990). Le récepteur NTSR1, de 47 kDa, est constitué de sept domaines transmembranaires, 3 boucles extracellulaires (E1-3) et 3 boucles intracellulaires (C1-3), une longue partie N-terminale, une courte partie C-terminale et est associé aux protéines  $G_{\alpha q/11}$ . Les boucles E1 et E3 présentent les sites d'interaction avec la NTS tandis que l'interaction avec les protéines G et l'activation de la PLC se fait par la boucle C3. Des sites de glycosylation sont présents dans la partie N-terminale et sont impliqués dans l'adressage du récepteur à la membrane. Un résidu aspartate est présent dans le second segment transmembranaire et confère à NTSR1 une sensibilité au sodium. La queue C-terminale présente deux acides aminés responsables de l'internalisation du récepteur (Figure 26) (Mitra, 2017; Vincent et al., 1999).

Comme pour la NTS, le récepteur NTSR1 est exprimé majoritairement dans le SNC et le tractus gastro-intestinal, mais a également été observé dans les cellules sanguines mononucléées (Vita et al., 1993). Ses fonctions incluent la diminution de la pression sanguine (Rioux et al., 1982), la relaxation et la contraction de l'iléon (Carraway and Mitra, 1994), l'analgésie (Roussy et al., 2008) et l'hypothermie (Feifel et al., 2010).

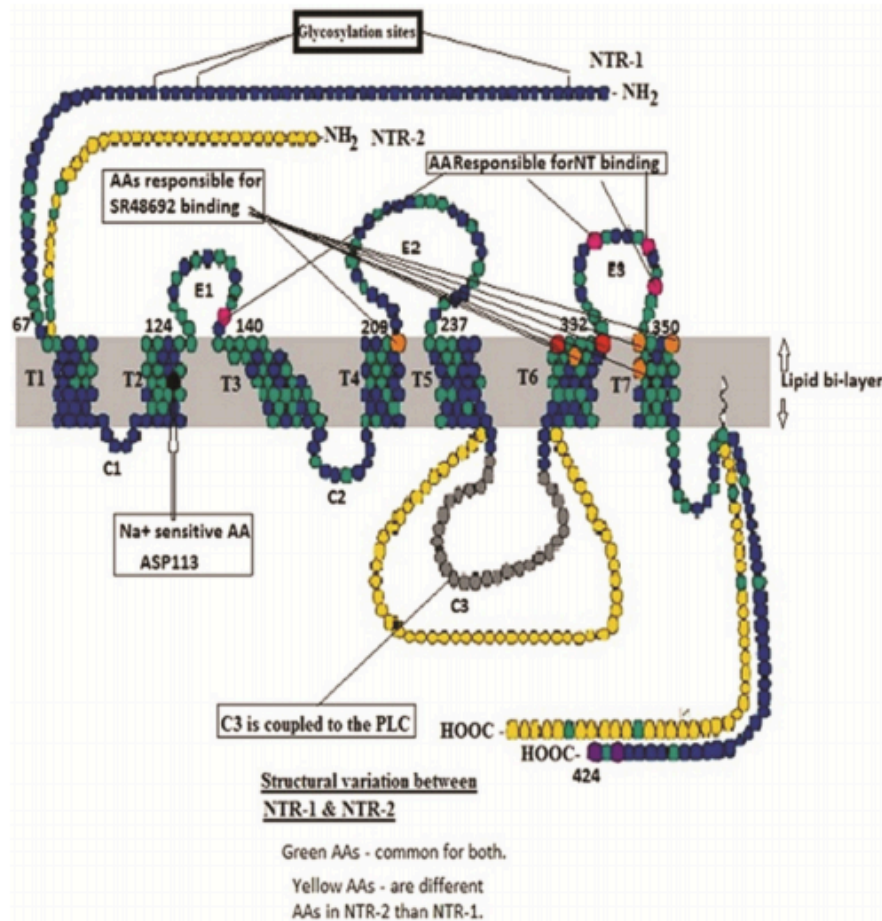


Figure 26 : Structure des récepteurs NTSR1 et NTSR2. Les résidus jaunes correspondent aux variations de peptides de NTSR2 par rapport à ceux de NTSR1 indiqués en bleu. Extrait de Mitra, 2017.

NTSR1 est le plus souvent associé à la protéine  $G\alpha_{q/11}$  et lors de la liaison de la NTS, la PLC est activée, déclenchant une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de ERK1/2 par Ras. Dans d'autres cas, NTSR1 est associé à  $G\alpha_{i/o}$ , induisant l'activation de ERK1/2 *via* l'activation de Src ainsi qu'une diminution de la production d'AMPc.

L'association avec  $G\alpha_s$  induit en revanche une augmentation de la production d'AMPc, ayant pour effet d'inhiber la signalisation par Ras et donc de moduler la



signalisation par la NTS. Une association avec  $G\alpha_{13}$  aurait quant à elle un rôle dans la signalisation par les petites Rho GTPases et la modulation des réarrangements cytosquelettiques (Besserer-Offroy et al., 2017). Enfin, l'arrêt du signal est induit par l'interaction de NTSR1 avec la  $\beta$ -arrestine 1 et 2. Suite à l'activation par la NTS, les résidus ser415, Thr416 et Ser417 sont phosphorylés, entraînant le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et l'internalisation du récepteur (Besserer-Offroy et al., 2017; Oakley et al., 2001). L'ensemble des voies de signalisation induites par NTSR1, ainsi que les stratégies d'inhibition (détaillées dans la partie III.4.) sont résumés en Figure 27.

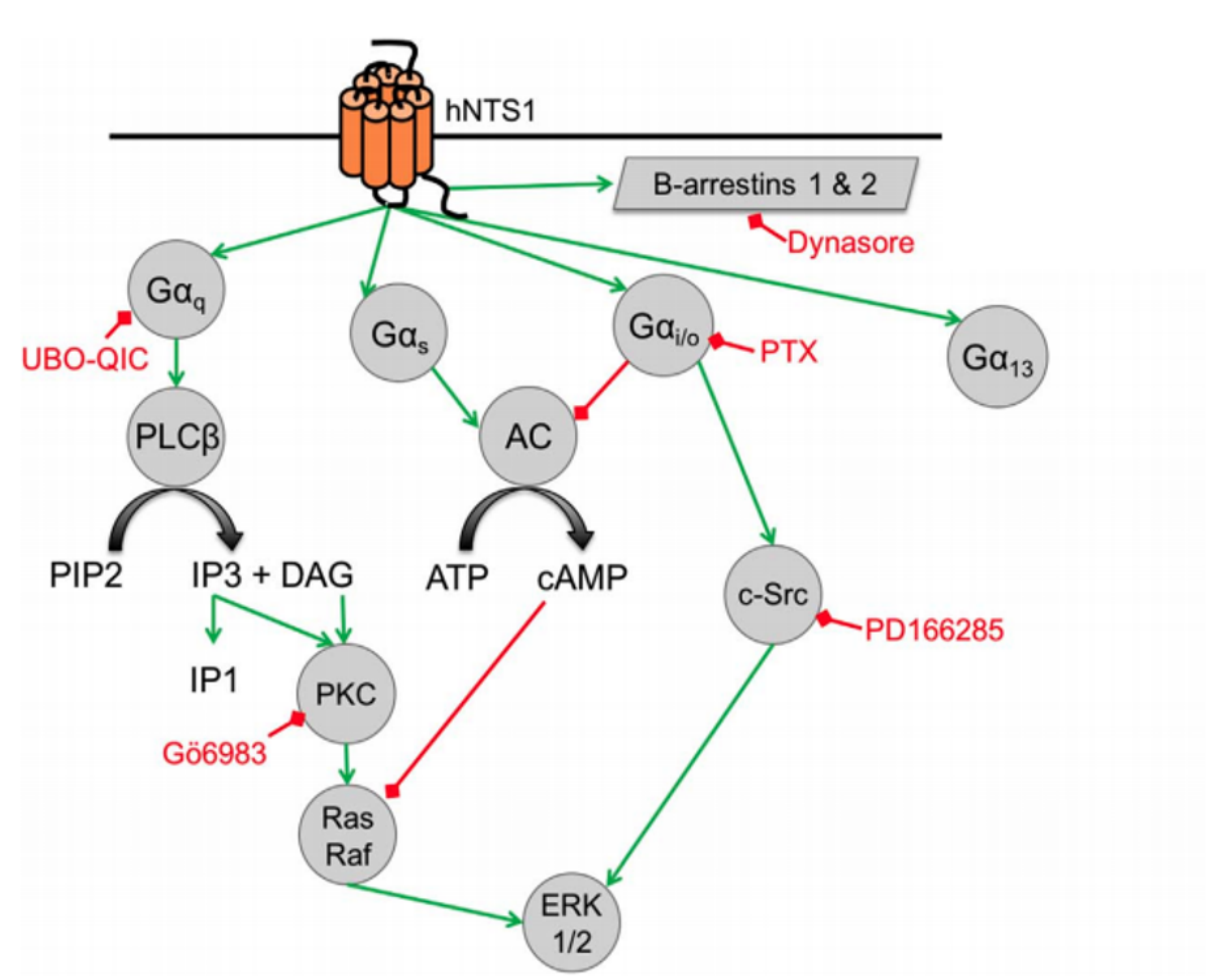


Figure 27 : Voies de signalisations induites par NTSR1 et inhibiteurs associés (en rouge).  
Extrait de Besserer-Offroy et al., 2017

### III.2.2.2. Le récepteur de la neurotensine de type 2 (NTSR2)

Le récepteur NTSR2 est constitué de 420 acides aminés et présente une structure similaire à celle de NTSR1 (Figure 26) mais avec une extrémité N-terminale plus courte et sans site de glycosylation, une partie C-terminale plus longue, ainsi qu'une absence du résidu

aspartate (conférant à NTSR1 la sensibilité au sodium) (Vincent et al., 1999). NTSR2 a une affinité moindre pour la NTS comparée à celle de NTSR1 (Tanaka et al., 1990). Son expression a été observée majoritairement au sein du cerveau (Mazella et al., 1996), au niveau des neurones chez la souris et les rats ainsi que dans les cellules gliales et épendymaires de rat (Sarret et al., 1998; Walker et al., 1998). NTSR2 est exprimé dans les régions cérébrales responsables de la nociception (Sarret et al., 2003) et serait impliqué dans l'analgésie induite par la NTS, les souris *NTSR2<sup>-/-</sup>* perdant cet effet nociceptif (Dubuc et al., 1999; Maeno et al., 2004; Remaury et al., 2002). Dans des modèles murins de lésions cérébrales, l'expression de NTSR2 augmente dans les cellules gliales suite à l'induction de la lésion, signifiant une potentielle implication de NTSR2 en réponse à ces lésions (Nouel et al., 1997; Schotte et al., 1988).

Les mécanismes de transduction du signal par NTSR2 demeurent à ce jour peu étudiés et incertains (Dobner, 2005). Ces mécanismes ont été étudiés principalement en présence d'antagonistes des récepteurs NTSRs, la levocabastine, un inhibiteur spécifique de NTSR2 qui bloque de manière compétitive la liaison de la NTS, le SR48692 ou Meclinertant, ayant une forte affinité et spécificité pour NTSR1, et le SR142948A qui se lie à NTSR1 et NTSR2 avec la même affinité (Myers et al., 2009). Les modèles utilisés pour étudier ces mécanismes sont basés sur la transfection du récepteur dans des cellules et présentent des effets paradoxaux ; les antagonistes de NTSR2 jouant le rôle d'agonistes dans certains cas, tandis que la NTS agirait comme un antagoniste (Dobner, 2005). En effet, une première étude a indiqué que la NTS et la levocabastine stimulaient les flux chloriques activés par le  $Ca^{2+}$  *via* NTSR2 transfecté dans des ovocytes de xénope (Mazella et al., 1996). Dans la lignée CHO transfectée, NTSR2 est activé par les antagonistes SR48692 (Gully et al., 1993) et SR142948A (Gully et al., 1997), tandis que la NTS a un effet antagoniste (Botto et al., 1998; Richard et al., 2001; Vita et al., 1998; Yamada et al., 1998). Cependant, dans la lignée COS transfectée et des cultures de cellules granulaires du cervelet, NTSR2 active les MAPK ERK1/2 (Gendron et al., 2004; Sarret et al., 2002).

L'interaction de NTSR2 avec les différents types de protéines G n'est pas connu, mais il est suggéré qu'il pourrait interagir avec les protéines  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$  et  $G_{12/13}$  (Holst et al., 2004; Richard et al., 2001; Vita et al., 1998). Les mécanismes d'arrêt du signal et d'internalisation de NTSR2 sont inconnus, cependant il a été montré que le récepteur était internalisé après liaison de la NTS, et que cette internalisation déclenchait la signalisation par ERK1/2 (Ayala-Sarmiento et al., 2015; Gendron et al., 2004).

### III.2.2.3. La Sortiline

Les détails de la structure de la sortiline et des mécanismes de transport dans lesquels elle est impliquée sont détaillés dans la partie Introduction de la revue bibliographique incluse à ce manuscrit en Annexe 1 et ne seront donc pas détaillés ici.

La sortiline est une protéine de transport des protéines du Golgi vers la membrane plasmique, vers la sécrétion au sein d'exosomes ou de vésicules de sécrétion, mais également dans les voies lysosomales pour adresser ses partenaires vers les voies de dégradation après leur internalisation (Figure 28). La sortiline joue un rôle central dans la régulation des signalisations neurotrophiques et neurotensinergiques, par ses rôles de récepteur, co-récepteur et protéine de transport.

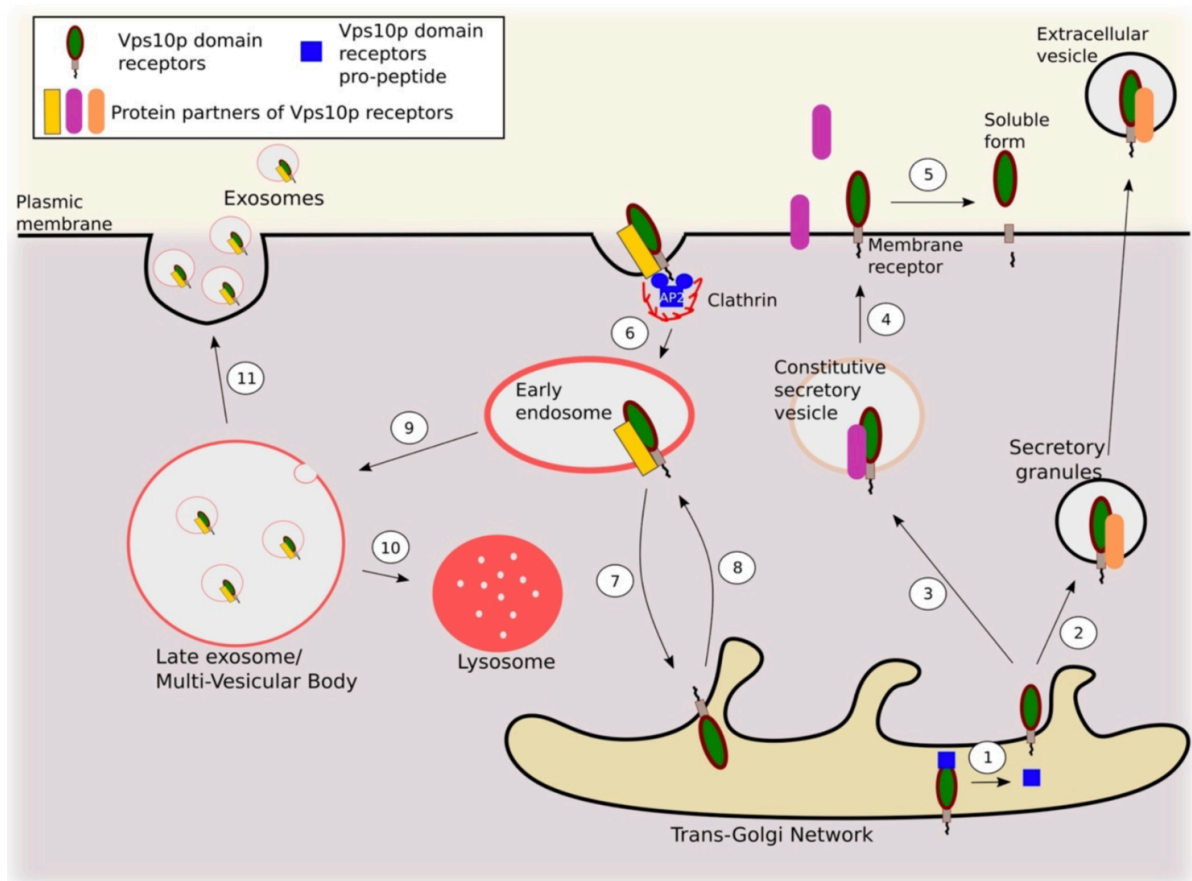


Figure 28 : Voies de transport de la sortiline

(sortiline symbolisée par « Vps10p domain receptors dans la légende). Le pro-peptide de la sortiline est clivé par des pro-protéases convertases au niveau du trans-Golgi (TGN) (étape 1). La sortiline, associée à ses protéines partenaires, est sécrétée du TGN vers des vésicules extracellulaires *via* des granules sécrétoires (étape 2) ou adressée à la membrane plasmique *via* des vésicules sécrétoires constitutives. Les partenaires de la sortiline peuvent alors être ancrés à la membrane ou sécrétés (étapes 3-4). Suite à son ancrage à la membrane, la sortiline peut subir des clivages protéolytiques par ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease) ou ADAM17, puis par la  $\gamma$ -secretase entraînant sa sécrétion sous forme soluble (étape 5). La sortiline peut également entraîner l'internalisation de ses partenaires depuis la membrane plasmique par endocytose dépendante du complexe AP-2/clathrine (étape 6). La sortiline peut naviguer, seule ou avec un partenaire, entre les endosomes précoces et le TGN *via* le complexe du rétomère (étape 7) ou par le transport antérograde *via* son interaction avec GPCRs/AP-1

(étape 8). Les endosomes précoces mûrissent en endosomes tardifs ou en corps multi-vésiculaires (étape 9). D'ici, la sortiline et ses partenaires sont soit adressés au lysosome pour dégradation (étape 10) ou sécrétés au sein d'exosomes (étape 11).

Comme mentionné précédemment, la sortiline interagit avec le récepteur p75<sup>NTR</sup>, et agit en tant que co-récepteur pour la liaison des pro-NT induisant l'apoptose des cellules (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005). En parallèle de ce rôle, la sortiline est également capable de lier les formes matures et immatures des NTs, permettant le transport de ces protéines du Golgi vers la membrane où elles seront sécrétées (Chen et al., 2005; Fauchais et al., 2008). En plus de réguler le transport des NTs, la sortiline régule également le transport de leurs récepteurs Trks (Vaegter et al., 2011).

La sortiline peut agir en tant que récepteur de la NTS dans les cellules de la microglie, où elle active les voies MAPK et PI3K/Akt, suggérant la capacité de la sortiline à induire seule une signalisation par la NTS, les récepteurs NTSR1 et NTSR2 étant absents de ces cellules (Dicou et al., 2004; Martin et al., 2003; Patel et al., 2016). Le pro-peptide de la sortiline bloque de manière efficace les effets induits par la NTS et pourrait ainsi constituer un agent bloquant (Mazella and Vincent, 2006). La sortiline interagit également avec les récepteurs NTSR1 et NTSR2. L'interaction avec NTSR2 dans des cellules pancréatiques est nécessaire à la signalisation pro-survie induite par la NTS (Béraud-Dufour et al., 2009). Une étude a également rapporté la présence d'un complexe sortiline/NTSR1 à la surface de cellules coliques HT29, ce complexe est internalisé après liaison de la NTS et régule négativement la signalisation induite par la NTS *via* NTSR1 (Martin et al., 2002).

### **III.2.3. La neurotensine et ses récepteurs dans les cancers**

La NTS et les voies de signalisation induites par son action sur ses récepteurs NTSR1 et NTSR2 sont impliquées dans le développement des cancers. La NTS stimule à la fois la survie, la progression tumorale et la propagation des métastases. Par des mécanismes indépendants de la NTS, la sortiline est également impliquée dans l'oncogenèse.

Dans les cas de cancers bronchiques à petites cellules et non à petites cellules, NTSR1 et NTS ont une expression élevée, associée à un mauvais pronostic. La NTS entraîne une sur-activation des récepteurs EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et HER 2/3 (*human epidermal growth factor 2/3*), accentuant la croissance tumorale et sa dissémination (Alifano et al., 2010; Moody et al., 2016; Younes et al., 2014). La sortiline participe à la promotion de

l'angiogenèse par la formation, et la régulation de la sécrétion dans des exosomes, d'un complexe TrkB/EGFR/Sortiline. Ces exosomes sécrétés par les cellules tumorales sont un signal pro-angiogénique pour les cellules endothéliales environnantes (Wilson et al., 2014).

Dans les cancers prostatiques, NTRS1 et NTSR2 sont surexprimés, avec une prédominance pour NTSR1 (Swift et al., 2010). La NTS active de manière autocrine les voies MAPK, PI3K/Akt et la signalisation par l'EGFR, induisant la progression du cycle cellulaire, la prolifération des cellules et l'invasion (Hassan et al., 2004; Sehgal et al., 1994; Vias et al., 2007)

NTSR1 et la NTS activent la voie MAPK dans les cancers colorectaux et favorisent la tumorigénèse et la progression tumorale (Bakirtzi et al., 2011; Gui et al., 2008). La forme soluble de la sortiline entraîne une désorganisation du cytosquelette et une rupture des desmosomes, aboutissant à l'initiation de la formation de métastases (Massa et al., 2014).

Les voies de signalisations de l'EGFR et PI3K/Akt sont activées par la NTS dans les cancers pancréatiques, induisant la prolifération et la migration des cellules tumorales (Guha et al., 2002, 2003; Mijatovic et al., 2007; Wang et al., 2011a). La voie MAPK est également activée, et est associée à l'expression de Bcl-2, dans les glioblastomes, où NTSR1 et la NTS sont fortement exprimés et de mauvais pronostic (Dong et al., 2017; Ouyang et al., 2015). Cette signalisation est associée à la survie et à l'invasion des cellules tumorales, et est liée à la signalisation par l'IL-8 et son récepteur CXCR1 activant STAT-3 (Ouyang et al., 2015; Zhou et al., 2014).

Dans le cancer du sein, la NTS entraîne l'activation de l'EGFR et de HER 2/3, de la voie des MAPK et est associée à l'expression de Bcl-2 (Dupouy et al., 2014; Somaï et al., 2002). Le pro-NGF, en stimulant TrkA de façon autocrine, induit la survie et l'invasion ganglionnaire des cellules tumorales. Cette signalisation par pro-NGF/TrkA est dépendante de la sortiline selon un mécanisme non identifié mais une régulation de la sécrétion du pro-NGF par la sortiline, ainsi que la formation d'un complexe de signalisation sortiline/TrkA sont suspectés. (Demont et al., 2012). L'agressivité des cellules tumorales de cancer du sein serait liée à l'activation sortiline-dépendante des voies de signalisation par la *Focal Adhesion Kinase* (FAK) et Src (Roselli et al., 2015). L'implication de la sortiline dans la signalisation par FAK et Src a également été détectée dans les tumeurs neuroendocrines. L'inactivation de la sortiline dans ce modèle entraîne une diminution de l'activation de ces voies, ainsi qu'une inhibition de la migration et de l'adhérence cellulaire (Kim et al., 2018).

L'ensemble des voies de signalisations activées par la NTS, NTSR1 et la sortiline ainsi que leurs implications oncogéniques est résumé en Figure 29.

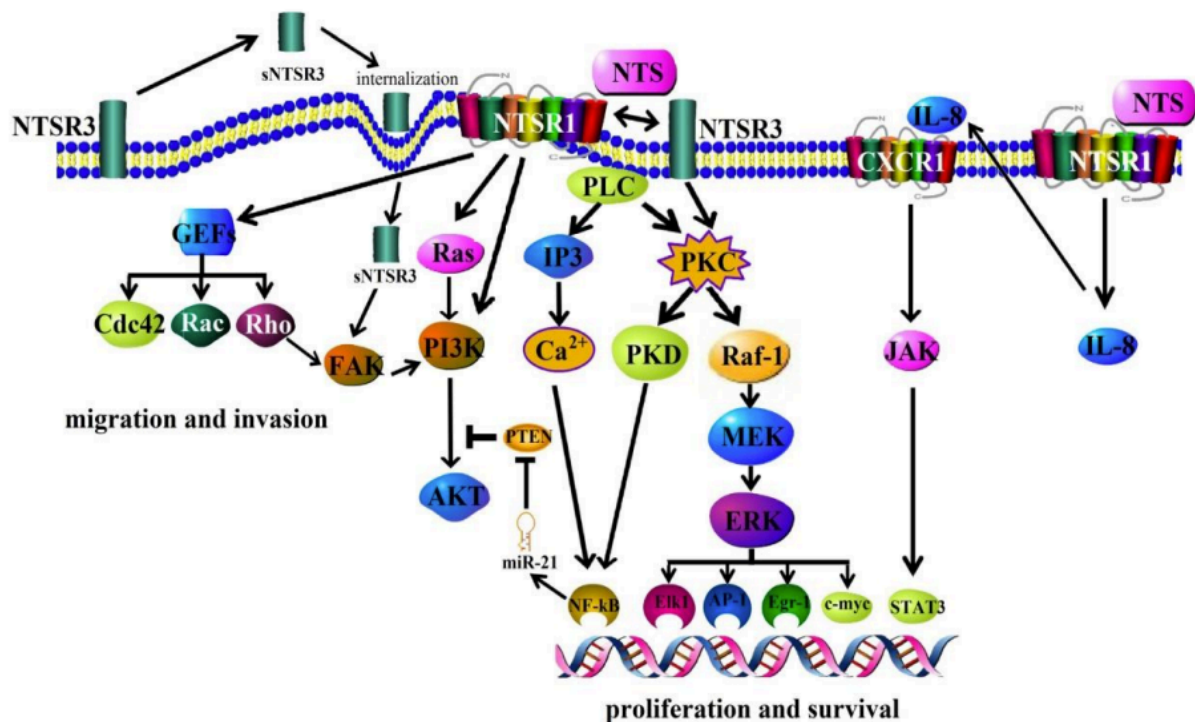


Figure 29 : Voies de signalisations induites par la neurotensine et ses récepteurs NTSR1 et sortiline.

Extrait de Ouyang et al., 2017

Peu de données concernant l'expression de NTSR2, elle a été détectée dans les cas de cancers de la prostate, de glioblastome et de LLC, mais son implication dans la progression tumorale et les signalisations associées n'ont pas été décrites (Ayala-Sarmiento et al., 2015; Saada et al., 2012; Swift et al., 2010).

### III.2.4. La neurotensine et ses récepteurs dans le système immunitaire

*L'implication de la sortiline dans le système immunitaire ne sera pas détaillée ici, elle fait l'objet d'une revue bibliographique incluse sous forme de manuscrit en Annexe 1 de ce manuscrit.*

Le récepteur NTSR1 est exprimé à la surface des lymphocytes T humains et la stimulation par la NTS aurait un effet inhibiteur sur la prolifération de ces cellules, tout en augmentant leurs capacités migratoires et de chimiotactisme (Evers et al., 1994; Ramez et al.,

2001). L'expression de la NTS a également été détectée au sein du thymus humain, suggérant une implication dans la régulation thymique (Mignini et al., 2011).

Dans le tissu intestinal, la NTS exerce une régulation de l'inflammation, en régulant notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi la NTS active la voie des MAPK et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et stimule la production d'IL-8 pro-inflammatoire (Castagliuolo et al., 1999; Koon et al., 2009; Zhao et al., 2003, 2007). Cet effet est également observé dans les cas de transactivation de NTSR1 et de l'IGF-1, ainsi que dans les cellules pancréatiques (Olszewski and Hamilton, 2009; Zhao et al., 2011).

Dans les mastocytes humains, la stimulation de NTSR1 par la NTS induit la libération d'histamine, et il a été suggéré que les concentrations élevées de NTS chez les patients atteints de dermatite atopique, une maladie inflammatoire immuno-allergique, participent à la pathogénèse par leur action sur les mastocytes (Cochrane et al., 2011; Vasiadi et al., 2013).

A l'inverse, dans les cellules dendritiques de la peau, la NTS induit par NTSR1 et la sortiline, une inhibition des voies de signalisation par NF- $\kappa$ B et JNK déclenchées par le LPS, ainsi qu'une diminution de la production du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et du VEGF (da Silva et al., 2011). La NTS induit également une diminution du potentiel inflammatoire des fibroblastes de la peau en réponse aux lésions cutanées (Pereira da Silva et al., 2014).

#### **III.2.4.1. Dans les lymphocytes B et les macrophages**

La NTS stimule l'activité phagocytaire des macrophages par une augmentation du calcium intracellulaire, ainsi que leur prolifération (De la Fuente et al., 1993; Moore et al., 1989). Elle favorise également la production d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  en conditions normales. Par contre, en condition hyperglycémique, la NTS inhibe les productions d'IL-12 et d'IL-1 $\beta$  et réduit ainsi l'effet inflammatoire induit par l'hyperglycémie. Par ailleurs, l'hyperglycémie entraîne une réduction des capacités migratoires des macrophages et un traitement à la neurotensine permet d'annuler l'effet anti-migratoire de cette condition (Moura et al., 2013). Plus récemment, il a été montré que dans des carcinomes hépatiques, une signalisation aberrante par la NTS active les voies MAPK et NF- $\kappa$ B, induisant une surproduction d'IL-8. L'IL-8 attire les macrophages CD68<sup>+</sup> et favorise leur polarisation en macrophages de type 2. L'axe NTS/IL-8 semble donc favoriser le développement des TAMs et participe à la formation d'un microenvironnement pro-oncogénique (Xiao et al., 2018).

Des travaux ont montré que les lignées de plasmocytes et de lymphocytes B humains expriment la sortiline. Dans ces cellules la sortiline exerce, comme décrit précédemment, un double rôle pro-survie ou pro-apoptotique selon ses partenaires. Son rôle pro-survie est exercé par la régulation de la sécrétion du BDNF, qui stimule la survie des cellules par l'activation de son récepteur TrkB de manière autocrine. Son second rôle, pro-apoptotique, est mis en place par l'interaction de la sortiline avec son co-récepteur de mort p75<sup>NTR</sup>, qui induit l'apoptose suite à la liaison du pro-BDNF (Bellanger et al., 2011; Fauchais et al., 2008). Les récepteurs NTSR1 et NTSR2 sont exprimés par les LB humains normaux, les lignées de LB, et les LB de patients atteints de LLC. L'induction d'un stress cellulaire entraîne une surexpression de NTSR1 et de la sortiline, et la NTS inhibe l'apoptose et stimule la prolifération des lignées de LB (Saada et al., 2012).

Les LB de patients atteints de LLC ont montré un profil d'expression très différent des LB normaux, avec une disparition de l'expression de la NTS, une diminution significative de NTSR1, tandis que l'expression de NTSR2 est fortement augmentée, suggérant une implication de ce récepteur dans les mécanismes de résistance à l'apoptose caractéristique des LB-LLC (Saada et al., 2012).

### **III.3. Interactions RCPGs / Trks**

Les communications croisées entre les récepteurs membranaires permettent de diversifier les voies de transduction des signaux intracellulaires en réponse à une pléthore de stimuli extracellulaires (Cattaneo et al., 2014a). De nombreuses interactions ont été décrites entre les RTKs et les RCPGs, qui impliquent la transactivation des récepteurs en présence du ligand de l'un des deux, et dans certains cas en absence de ligand (Cattaneo et al., 2014a). Différents mécanismes permettent cette transactivation. Les RCPGs peuvent activer des métalloprotéases ancrées à la membrane qui activeront ensuite les RTKs (Figure 30.A) (Leserer et al., 2000; Prenzel et al., 1999). En absence de ligand, les RCPGs peuvent recruter des seconds messagers tels que des ions calciums, la PKC, les protéines tyrosine kinases Src et Pyk (Figure 30.C), la  $\beta$ -arrestine ou des ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Figure 30.B) qui induiront la phosphorylation et l'activation des RTKs (Andreev et al., 2001; Chen et al., 2012; El-Shewy et al., 2011; Esposito et al., 2011; Gesty-Palmer et al., 2013; Tilley et al., 2009).

Bien que moins décrits, les RTKs sont également capables de transactiver les RCPGs. Cette transactivation se fait par la formation d'un complexe RTK/RCPG et la liaison du ligand sur le RTK. La stimulation du RTK entraîne l'activation notamment de c-Src, qui va



phosphoryler les résidus tyrosines cytoplasmiques des RCPGs et ainsi promouvoir leur signalisation puis le recrutement de la  $\beta$ -arrestine pour internalisation du complexe (Figure 30.D) (Cattaneo et al., 2014a).

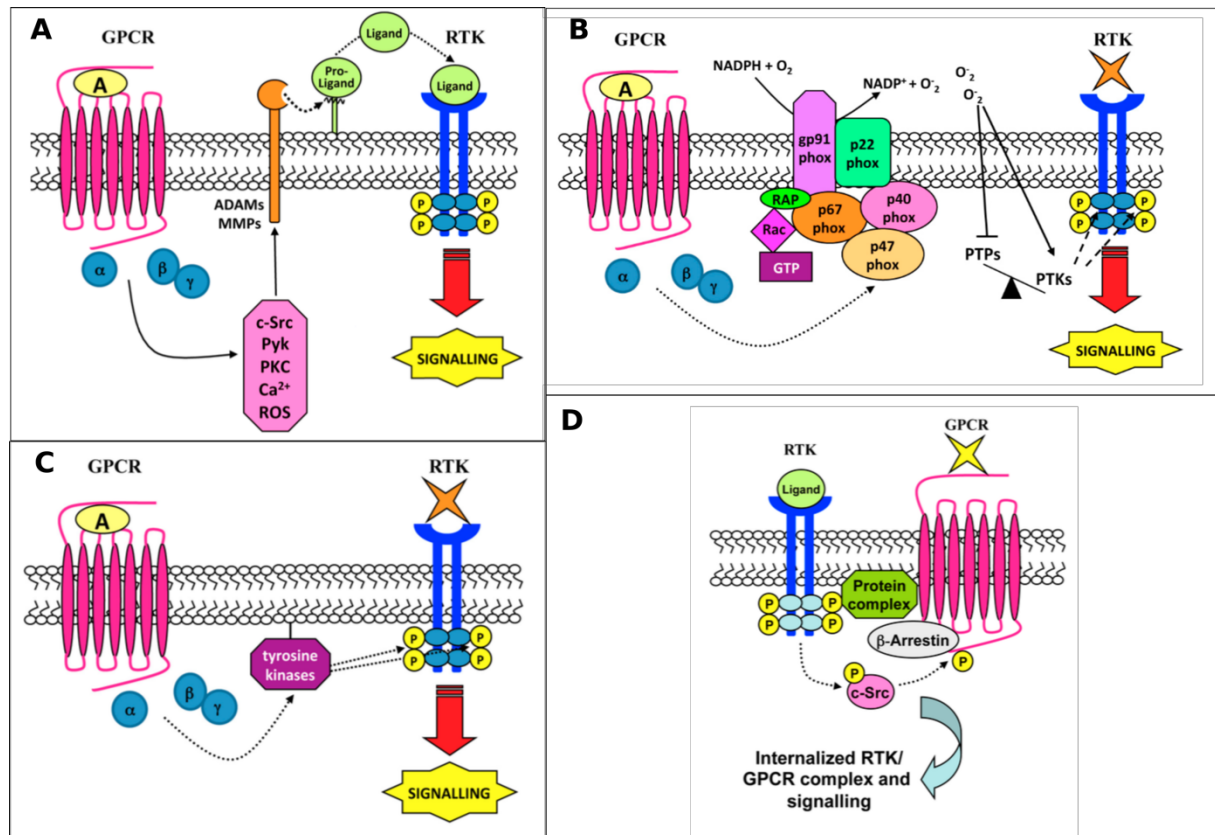


Figure 30 : Mécanismes de transactivation des RTKs et des RCPGs.

**A.** Transactivation ligand-dépendante des RTKs suite à l'activation des métalloprotéases par les RCPGs **B.** Transactivation ligand-indépendante des RTKs par activation des ROS par les RCPGs **C.** Transactivation ligand-indépendante des RTKs par les RCPGs par activation de tyrosines kinases intracellulaires par les RCPGs **D.** Transactivation ligand-indépendante des RCPGs par formation d'un complexe protéique et l'activation de la tyrosine kinase Src par les RTKs.

Extrait de Cattaneo et al., 2014a

De nombreux mécanismes de transactivation des récepteurs Trk ont été mis en évidence (Mitre et al., 2017). Dans des cultures neuronales, la sérotonine active six RCPGs (5-HT1, 5-HT2, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 et 5-HT7) qui déclenchent les mécanismes d'oxydation par NADPH et induit la transactivation des récepteurs PDGFR- $\beta$  et TrkB (Kruk et al., 2013a). L'adénosine et le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) se lie à leurs RCPGs respectifs et induisent la transactivation de TrkA et sa signalisation par PI3K/Akt ayant des effets neuroprotecteurs (Lee and Chao, 2001; Lee et al., 2002; Takei et

al., 2000). Les voies de transactivation induites par l'adénosine et la sérotonine requièrent également l'activité de la PLC et des tyrosines kinases Src et Fyn (Kruk et al., 2013b; Rajagopal and Chao, 2006). Une autre interaction a été observée entre le récepteur TrkA avec S1P1/VEGFR2 qui forment un complexe de signalisation associé à la PKC et à ERK, capables de se transactiver sans nécessité d'action de tyrosine kinase (Bergelin et al., 2010).

D'autres ligands permettent la transactivation des récepteurs Trk, notamment les glucocorticoïdes qui interagissent avec la signalisation du BDNF (Jeanneteau et al., 2008). La signalisation par l'EGF induit également une activation des récepteurs TrkB et TrkC (Puehringer et al., 2013).

Un complexe composé de TrkA, EGFR et FPR (*formyl peptide receptor*), un RCPG, a été observé. La fixation du ligand de FRP entraîne l'activation des ROS et de la métalloprotéase MMP-9 qui clive le pro-EGF et entraîne une transactivation de TrkA et EGFR de façon Src et Erk-dépendante (El Zein et al., 2010).

La neurotensine et l'activation de son récepteur NTSR1 a quant à elle été reliée à une activation rapide de Src, et la phosphorylation de la tyrosine Y845 de l'EGFR (Amorino et al., 2007). Cette transactivation a été associée à une augmentation de la croissance et de l'agressivité de tumeurs bronchiques (Moody et al., 2014; Younes et al., 2014) et du sein (Dupouy et al., 2014).

### **III.4. Ciblage thérapeutique des voies des neurotrophines et de la neurotensine**

#### **III.4.1. Ciblage thérapeutique de la voie de la neurotensine**

La signalisation par la neurotensine, et notamment par son action sur le récepteur NTSR1 semble de plus en plus avoir un rôle direct dans les mécanismes de croissance et de progression tumorale. La signalisation par NTSR1 a été incriminée dans les cancers du côlon (Gui et al., 2008; Souazé et al., 2006a), du poumon (Alifano et al., 2010), du pancréas (Wang et al., 2011a, 2000), du sein (Dupouy et al., 2009), et les carcinomes de la tête et du cou (Shimizu et al., 2008). Le récepteur NTSR2 n'est que rarement détecté dans les cellules tumorales (Schulz et al., 2006), il a cependant été observé dans les LB-LLC (Saada et al., 2012) et est surexprimé dans les cellules de cancer de la prostate de phénotype luminal (Swift et al., 2010). L'estimation de l'impact de NTSR2 sur la tumorigénèse nécessite plus d'études, et ce récepteur ne constitue donc pour le moment pas une cible thérapeutique explorée.

Des études ont montré que des souris déficientes en NTS et/ou NTSRs sont viables et ne présentent pas de troubles physiologiques ni de comportement. Cette voie pourrait ainsi constituer une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales (Wu et al., 2013). La première approche consiste à utiliser les inhibiteurs de NTSR1, le SR48692 et le SR142948A. Ces molécules ont été utilisées avec succès pour inhiber les effets oncogéniques de NTSR1 mais leur efficacité est limitée face à de fortes stimulations autocrines par la NTS et à fortes doses le SR48692 devient toxique pour les cellules et peut également agir comme agoniste de NTSR2 (Yamada et al., 1998). Chez la souris, l'utilisation du SR48692 inhibe la croissance de tumeurs du colon, du sein, du pancréas et du poumon (Maoret et al., 1999; Moody et al., 2001; Souazé et al., 2006b). Ce traitement retarde la croissance tumorale en contrecarrant la signalisation de la NTS, associée à la survie et la prolifération plus qu'aux transformations oncogéniques. Il serait donc plutôt utilisé en traitement adjuvant, améliorant les effets d'autres thérapies anti-tumorales. Ce cas est observé lors de l'inhibition de NTSR1 dans des cellules tumorales de prostates greffées à des souris, sensibilisant ces cellules à la radiothérapie (Valerie et al., 2011). Le SR48692 permet également d'améliorer les réponses aux traitements à la carboplatine des cellules de tumeurs ovariennes en augmentant le taux d'apoptose tout en diminuant l'efflux de drogues (Liu et al., 2017).

Une seconde approche plus ciblée consiste à exploiter le mécanisme d'endocytose de NTSR1 suite à la liaison de la NTS. Ainsi, une particule de transfert de gène a été associée à six molécules de NTS liées de façon covalente à une poly-lysine permet le transfert d'un gène thérapeutique à des cellules tumorales surexprimant NTSR1 (Arango-Rodriguez et al., 2006). L'injection de ces nanoparticules Neurotensin-Polyplex dans la circulation sanguine de souris ayant reçu une xénogreffe de cellules tumorales de cancer du sein permet le transfert du gène suicide *HSVtk* et inhibe ainsi la croissance tumorale (Castillo-Rodríguez et al., 2014). Des systèmes similaires ont été développés pour délivrer directement en intracellulaire du 5-FdU, (Falciani et al., 2010a, 2010b), ou du cis,cis,transdiamminedichlorodisuccinatoplatinum(IV) (Gaviglio et al., 2012), améliorant leur cytotoxicité sur les cellules tumorales. Enfin des radiopharmaceutiques analogues de la NTS ont été développés. NT-XIX, DOTA-NT20.3 et DOTA-NT-20.4 montrent une forte affinité pour NTSR1 et permettent à la fois la localisation des tumeurs NTSR1 positives par radio-imagerie tout en délivrant une radioactivité aux cellules, inhibant la croissance tumorale (Alshoukr et al., 2009, 2011; García-Garayoa et al., 2009).

### III.4.2. Ciblage thérapeutique de la voie des neurotrophines

Un intérêt croissant émerge pour le développement de traitements ciblant les récepteurs Trks depuis l'identification de leur implication dans les processus tumoraux. De nombreux inhibiteurs ont été développés dans le but d'inhiber les voies de signalisation induites par les Trks et d'améliorer les réponses thérapeutiques obtenues par les traitements conventionnels.

Le premier inhibiteur développé est le K252a, un alcaloïde naturel, qui inhibe de façon compétitive la fixation de l'ATP au domaine catalytique des kinases. Le K252a agit comme inhibiteur des récepteurs TrkA, TrkB et TrkC (Morotti et al., 2002; Tapley et al., 1992). Les autres inhibiteurs de première génération comprennent le lestauritinib, l'AZ64, l'AZ623 et le GNF-4256, inhibiteurs des trois récepteur Trk, ainsi que la cyclotraxine B et l'ANA-12, inhibiteurs de TrkB. Ces inhibiteurs spécifiques ont montré une efficacité dans le traitement des neuroblastomes et cancers de la prostate pour le lestauritinib (Iyer et al., 2010; Weeraratna et al., 2001), des neuroblastomes pour AZ64, l'AZ623 et le GNF-4256 (Iyer et al., 2012; Zage et al., 2011).

De nouveaux inhibiteurs sont également en cours de développement. L'entrectinib inhibe les Trks avec une efficacité hors-norme tout en inhibant également les oncogènes ROS1 et ALK, qui sont des cibles prometteuses dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules, des glioblastomes, des carcinomes coliques, rénaux et mammaires, et des mélanomes (Ardini et al. 2016; Drilon et al. 2017; Iyer et al. 2016; Rolfo et al. 2015; Russo et al. 2016). Un autre inhibiteur, LOXO-101 est efficace en tant que traitement de plusieurs types de cancers (Doebele et al., 2015). Des fusions entre les gènes *NTRK1*, *2 et 3* et d'autres gènes ont été rapportées dans 11 types de cancers différents, notamment les cancers du poumon, le glioblastome ou le cancer du sein. Par exemple, environ 93% des carcinomes sécrétoires du sein présentent la fusion *ETV6-NTRK3*. Ces cancers ont démontré une bonne réponse aux traitements par LOXO-101 et l'entrectinib, qui sont actuellement en phase 2 d'essai clinique (Lange and Lo, 2018).

De nombreux inhibiteurs sont en cours d'essai clinique (GNF-5837, MGCD516, PLX7486, DS7486, DS6051b et TSR-011) ou d'investigation/développement (GNF-4256, GNF-5837, HS-345, AZ623, AZD6918 et CEP701) (Meldolesi, 2018). Mais l'inhibition des Trks peut également se faire par des anticorps monoclonaux (Demir et al., 2016) ou des silencing RNAs spécifiques (Bernard-Gauthier and Schirmacher, 2016).

L'avantage des inhibiteurs de Trk est que leur mécanisme d'action diffère grandement des traitements chimiothérapeutiques classiques, qui peuvent donc être utilisés en combinaison sans aggravation des effets secondaires. Ces combinaisons ont démontré des résultats hautement synergiques, tout en éliminant certaines résistances (Meldolesi, 2018). Le K252a et l'ANA-12 entrent en synergie avec des drogues anti-cancéreuses, entraînant l'arrêt de la croissance de DLBCL et de sarcomes d'Ewing (Dubanet et al., 2015; Heinen et al., 2016). Les combinaisons actuelles mettent en jeu les inhibiteurs de Trk entrectinib, LOXO-101, GNF-4256, AZ623, et AZD6918, combinés avec les molécules chimiothérapeutiques, irinotecan, paclitaxel, topotecan, lestaurtinib, doxorubicin, cisplatine, et etoposide. Ces combinaisons ont montré de bonnes réponses aux traitements des glioblastomes, gliomes, neuroblastomes et cancers du sein (Chakravarthy et al., 2016; Croucher et al., 2015; Heinen et al., 2016; Iyer et al., 2010; Li et al., 2015; Pinet et al., 2016; Tajbakhsh et al., 2017; Wang et al., 2015; Zage et al., 2011). La combinaison avec l'anticorps monoclonal rituximab inhibe la croissance des DLBCL (Dubanet et al., 2015).

En conclusion, le ciblage thérapeutique des récepteurs aux neurotrophines, les Trks, et du récepteur à la neurotensine NTSR1 afin d'enrayer la progression tumorale semble être une stratégie prometteuse, qui s'est d'ores et déjà révélée efficace et bien tolérée par les patients. L'implication des récepteurs aux neurotrophines et de NTSR1 dans les processus tumoraux ne fait plus de doute, mais les études portant sur celle de la sortiline n'en sont qu'à leurs prémices, tandis que la fonction oncogénique de NTSR2 est totalement inconnue, et réclament donc de plus amples investigations.

# Le complexe NTSR2-TrkB dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique (LLC)

## V.1. Préambule article 1

Des résultats obtenus précédemment au sein de notre équipe ont montré une surexpression, au niveau transcriptionnel, du récepteur NTSR2 dans les lymphocytes B de patients atteints de LLC (Saada et al., 2012). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que ce récepteur pourrait être impliqué dans les mécanismes de résistance constitutive à l'apoptose caractéristiques des LB-LLC (Schriever and Huhn, 2003).

Cette hypothèse s'est confirmée par l'inhibition pharmacologique et par siRNA (*small interfering RNA*) de NTSR2, réalisée au cours de notre étude, qui est associée à une diminution drastique de la viabilité cellulaire, une diminution de l'activation de la protéine kinase Src et une diminution de l'expression de Bcl-2 et Bcl-XL. A l'inverse, dans des modèles de surexpression de NTSR2, l'activation des kinases Src, JNK, p38 et Akt est augmentée, de même que l'expression de Bcl-2 et Bcl-XL. Le récepteur NTSR2 est donc bien responsable d'une signalisation pro-survie dans les cellules leucémiques.

Cette signalisation n'est cependant pas liée à une boucle autocrine de survie étant donné que l'expression du ligand de NTSR2, la NTS, est diminuée dans les cellules leucémiques, de même que sa concentration plasmatique. L'activation de NTSR2 passerait ainsi par un autre mécanisme. Le récepteur NTSR1 est connu pour être transactivé par un récepteur à activité tyrosine kinase, l'EGFR (Dupouy et al., 2014; Younes et al., 2014), et la sortiline interagit avec les récepteurs aux NTs, Trks et p75<sup>NTR</sup> (Nykjaer and Willnow, 2012a; Vaegter et al., 2011; Wilson et al., 2014), nous avons donc investigué l'activation potentielle de NTSR2 par un co-récepteur.

D'après de précédentes études (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015; Fauchais et al., 2008; Hillis et al., 2016; Pearse et al., 2005) le récepteur TrkB et son ligand, le BDNF, sont impliqués dans de nombreuses hémopathie malignes. Nous avons donc supposé que TrkB pourrait agir de concert avec NTSR2 dans les LB-LLC. Une surexpression de TrkB dans les cellules leucémiques et une augmentation des concentrations plasmatiques de BDNF ont été observées. Par ailleurs, les récepteurs NTSR2 et TrkB interagissent physiquement, au

niveau de la membrane plasmique des LB-LLC, et la formation de ce complexe est stimulée par le BDNF. Un traitement des LB-LLC par ajout de BDNF exogène induit une signalisation par Src et une augmentation de l'expression de Bcl-2 et Bcl-XL.

NTSR2 active la voie de signalisation par Src suite au recrutement d'une protéine  $G_{i\alpha}$  qui permet la transduction du signal. Ce recrutement est dépendant de l'activation de TrkB par le BDNF, et la signalisation pro-survie par Src est inhibée lorsque le récepteur TrkB est inactivé. L'inhibition de NTSR2 a quant à elle le même effet et abolit la signalisation pro-survie induite par BDNF/TrkB.

L'ensemble de ces résultats montre ainsi qu'il existe à la membrane des LB-LLC un complexe NTSR2-TrkB qui forme une plateforme de signalisation activée par le BDNF. La liaison du BDNF à son récepteur TrkB entraîne une transactivation de NTSR2 qui recrute alors une protéine  $G_{i\alpha}$  pour activer les voies de signalisation de survie par Src et les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Le complexe NTSR2-TrkB serait ainsi un acteur majeur de la résistance à l'apoptose des LB-LLC, et pourrait constituer une cible prometteuse pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés dans l'article suivant, intitulé « Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis », publié dans le journal *Oncogene* en 2018, en co-premier auteur avec A. Abbaci.

## V.2. Article 1

Article publié dans le journal *Oncogene* en co-premier auteur

# Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis

A Abbaci\*, H Talbot\*, S Saada, N Gachard, J Abraham, A Jaccard, D Bordessoule, AL Fauchais, T Naves, and MO Jauberteau

## ORIGINAL ARTICLE

## Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis

A Abbaci<sup>1,7</sup>, H Talbot<sup>1,7</sup>, S Saada<sup>1</sup>, N Gachard<sup>2,3</sup>, J Abraham<sup>4</sup>, A Jaccard<sup>3,4</sup>, D Bordessoule<sup>3,4</sup>, AL Fauchais<sup>1,5,8</sup>, T Naves<sup>1,8</sup> and MO Jauberteau<sup>1,6,8</sup>

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells are resistant to apoptosis, and consequently accumulate to the detriment of normal B cells and patient immunity. Because current therapies fail to eradicate these apoptosis-resistant cells, it is essential to identify alternative survival pathways as novel targets for anticancer therapies. Overexpression of cell-surface G protein-coupled receptors drives cell transformation, and thus plays a critical role in malignancies. In this study, we identified neurotensin receptor 2 (NTSR2) as an essential driver of apoptosis resistance in B-CLL. NTSR2 was highly expressed in B-CLL cells, whereas expression of its natural ligand, neurotensin (NTS), was minimal in both B-CLL cells and patient plasma. Surprisingly, NTSR2 remained in a constitutively active phosphorylated state, caused not by a mutation-induced gain-of-function but rather by an interaction with the oncogenic tyrosine kinase receptor TrkB. Functional and biochemical characterization revealed that the NTSR2–TrkB interaction acts as a conditional oncogenic driver requiring the TrkB ligand brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which unlike NTS is highly expressed in B-CLL cells. Together, NTSR2, TrkB and BDNF induce autocrine and/or paracrine survival pathways that are independent of mutation status and indolent or progressive disease course. The NTSR2–TrkB interaction activates survival signaling pathways, including the Src and AKT kinase pathways, as well as expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL. When NTSR2 was downregulated, TrkB failed to protect B-CLL cells from a drastic decrease in viability via typical apoptotic cell death, reflected by DNA fragmentation and Annexin V presentation. Together, our findings demonstrate that the NTSR2–TrkB interaction plays a crucial role in B-CLL cell survival, suggesting that inhibition of NTSR2 represents a promising targeted strategy for treating B-CLL malignancy.

*Oncogene* (2018) 37, 756–767; doi:10.1038/onc.2017.365; published online 23 October 2017

## INTRODUCTION

Resistance to cell death is often associated with replicative immortality and chemotherapy evasion, two central hallmarks of cancer. This feature is particularly prominent in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL),<sup>1</sup> in which it leads to the accumulation of malignant mature B lymphocytes.<sup>2</sup> Several factors have been implicated in CLL development, including mutations in the immunoglobulin heavy-chain variable region gene (*IGHV*) and genomic alterations (deletion, translocation, trisomy and non-synonymous mutations) used as prognostic markers for indolent or aggressive disease course.<sup>3</sup> Despite these molecular and genetic findings, however, no curative molecules that can definitively eradicate apoptosis-resistant B-CLL are yet available. Hence, identification of as-yet-unknown mechanisms involved in B-CLL cell survival pathways could provide new targets for anticancer therapies.

Cell-surface receptors, especially G protein-coupled receptors (GPCRs), have emerged as crucial players in malignancies. Several studies show that GPCRs participate actively in signal transduction involved in control of homeostatic processes, including the balance between cell death and proliferation.<sup>4</sup> In lymphocytes,

GPCRs coupled to heterotrimeric G proteins, notably G<sub>i</sub>αs, regulate multiple immune functions and engage in cross-talk with other signaling pathways, including those mediated by tyrosine kinase receptors (TKRs)<sup>5,6</sup> such as the Src family of protein kinases (SRC) and the phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B (for example, PI3K/AKT).<sup>7</sup> Thus, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), for example, ERK and JNK and the expression of anti-apoptotic proteins belonging to the Bcl-2 family (for example, Bcl-2, Bcl-xL) remain constitutively activated.<sup>8</sup> These observations suggest that malignant cells can hijack the physiological function of GPCRs for their survival.<sup>9</sup> Accordingly, GPCR activation might be associated with B-CLL pathogenesis.

To more precisely delineate the potential function of GPCRs in apoptosis evasion by B-CLL cells, we investigated the role of the neurotensin receptors (NTSRs). Two of these proteins, NTSR1 and NTSR2, are GPCRs, whereas NTSR3/sortilin, which has a single transmembrane domain, plays a major role as a sorting receptor.<sup>10</sup> NTSR1 drives homeostatic processes in the nervous and gastrointestinal systems, but is also actively involved in overexpression of anti-apoptotic proteins and chemotherapy resistance in cancer.<sup>11,12</sup>

<sup>1</sup>Limoges University, Equipe Accueil 3842, Cellular Homeostasis and Diseases, Faculty of Medicine, Limoges Cedex, France; <sup>2</sup>Hematology Laboratory, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France; <sup>3</sup>CNRS-UMR 7276, Limoges University, Limoges Cedex, France; <sup>4</sup>Department of Hematology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France; <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France and <sup>6</sup>Department of Immunology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France. Correspondence: Professor M-O Jauberteau, EA3842, Laboratoire Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Faculté de Médecine, 2, Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

E-mail: m-o.jauberteau-marchan@unilim.fr

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>8</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 5 May 2017; revised 29 July 2017; accepted 25 August 2017; published online 23 October 2017



Because NTSR1 is often dysregulated in solid cancers<sup>13</sup> and previous work by our group showed that NTSRs are differentially expressed in normal and malignant B lymphocytes,<sup>14</sup> we were interested in studying the potential roles of this GPCR subfamily in B-CLL. In this study, we found that NTSR2, but not NTSR1, was aberrantly overexpressed in B-CLL. Both in NTSR2-overexpressing B-cell models and in cells derived from B-CLL patients, inhibition of NTSR2 by mRNA silencing sensitized cells to apoptosis, pursuant to a decrease in expression of anti-apoptotic proteins. We found that NTSR2 in B-CLL cells is in a constitutively active phosphorylated state, which was reversible by a NTSR2-specific inhibitor. NTSR2 activation is independent of its natural ligand, neurotensin (NTS), and is instead the consequence of its interaction with the TKR tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB) and the recruitment of G $\alpha$  proteins. Thus, this complex acts as a conditional oncogene dependent on the TrkB ligand, BDNF, which is highly expressed in B-CLL. We present novel data demonstrating that the NTSR2–TrkB interaction and the sustained activation of the signaling pathways under the control of these two actors constitute an essential driving force for apoptosis evasion in B-CLL.

## RESULTS

NTSR2 is overexpressed in B-CLL

Based on our previous observation that NTSRs are differentially expressed in malignant human B lymphocytes and drive resistance to Fas ligand-mediated cell death, we speculated that NTSRs contribute to apoptosis resistance in B-CLL pathogenesis. We first compared expression of *NTSR* genes in B lymphocytes between healthy donors (HDs) (Normal B,  $n=15$ ) and B-CLL patients (B-CLL,  $n=30$  patients). *NTSR1* was undetectable in B-CLL cells, whereas *NTSR2* was strongly expressed, at levels 30-fold higher ( $P < 0.001$ ) than in normal B lymphocytes (Figure 1a). The profile of *NTSR2* expression, which was similar between indolent and progressive B-CLL, was independent of B-CLL markers such as *TP53* deletion, *IGHV* mutation, 13q14 deletion and CD38 expression, indicating that *NTSR2* does not represent a discriminant marker for B-CLL stage (Figure 1b). Analysis of NTSR expression at the protein level confirmed the mRNA results: NTSR2 was overexpressed in B-CLL, whereas NTSR1 was undetectable (Figures 1c and d).

The abnormal expression of NTSR2, independent of B-CLL stage and progression, led us to investigate the roles of the primary mechanisms responsible for GPCR overexpression, that is, gene mutations and chromosomal abnormalities.<sup>9</sup> To this end, we sequenced *NTSR2* and analyzed the karyotypes of 10 B-CLL patients. None of the B-CLL cases harbored mutations in the *NTSR2* gene, except for two patients with a silent polymorphism (*rs114415067*, *pH55H*) (data not shown). Moreover, *NTSR2* mutations are present in only 0.3% of the 19 141 samples in COSMIC v62, indicating that *NTSR2* mutations are rare in all combined pathologies.<sup>15</sup>

Together, the significant increase in *NTSR2* mRNA and protein levels suggested that NTSR2 plays a role in the pathogenesis of B-CLL, regardless of the biological and clinical features of this disease.

NTSR2 depletion sensitizes B-CLL lymphocytes to apoptosis

Given that B-CLL lymphocytes exhibit apoptosis resistance, a hallmark of this disease, we sought to determine whether *NTSR2* downregulation would sensitize B-CLL cells to programmed cell death. To this end, we performed mRNA silencing assays with a pool of four different siRNAs directed against *NTSR2* mRNA (Figures 2a–f).

In the four patients tested, *NTSR2* silencing triggered a drastic decrease in cell viability, from 86 to 24%, after 72 h (Figure 2c,

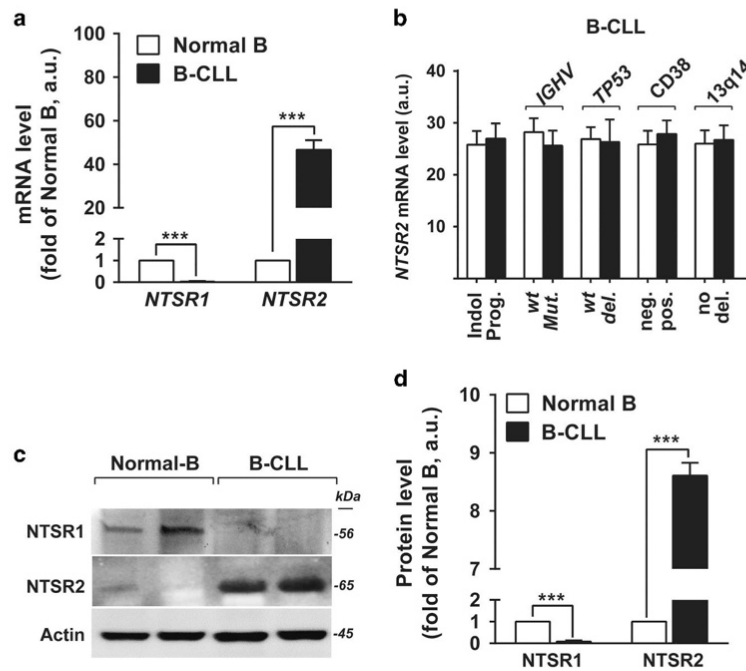
$P < 0.001$ ). To extend these observations, we investigated the pro-apoptotic effect of NTSR2 silencing after 48 h using flow cytometry to detect Annexin V/PI (propidium iodide) staining (Figures 2d and e). *NTSR2* depletion significantly increased the percentage of Annexin V-positive cells, reflecting induction of apoptosis ( $n=4$ ,  $P < 0.01$ , Figures 2d and e). However, we observed no alternative cell death (Annexin V<sup>negative</sup>/PI<sup>positive</sup>) (Figure 2d). Further evidence for apoptosis was obtained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect DNA fragmentation.<sup>16</sup> Consistent with the results of flow cytometry, *NTSR2* depletion triggered DNA fragmentation, as demonstrated by elevated levels of cytoplasmic nucleosomes ( $P < 0.01$ , Figure 2f) in comparison to control and isolated normal B cells (Supplementary Figures 1a–c).

In B-CLL pathogenesis, both survival signaling and anti-apoptotic proteins are often dysregulated (Supplementary Figures 1d–f). Accordingly, we investigated the expression of the Src pro-survival signaling pathways and the anti-apoptotic protein Bcl-2 following *NTSR2* depletion. Although Bcl-2 was highly expressed in B-CLL cells (Supplementary Figure 1f), its levels decreased significantly upon *NTSR2* depletion (Figures 2g and i). Likewise, the pro-survival kinase Src exhibited a decrease in constitutive phosphorylation (Figures 2g and h), suggesting that *NTSR2* makes a major contribution to Src kinase activation and expression of anti-apoptotic proteins.

In the following experiments, we used two human B-lymphocyte cell lines, one from lymphoma (BL-41) and one from B-CLL (MEC-1). Although endogenous expression of NTSR2 was higher in BL-41 and MEC-1 than in normal B cells, it was lower than in B-CLL (Supplementary Figure 1g). Hence, to achieve comparable expression levels between models, we overexpressed NTSR2 in both BL-41 and MEC-1 cells (Supplementary Figure 2a). Because the NTSR2 signaling pathway is connected to three major MAPK pathways, that is, ERK1/2, p38 and JNK, as well as the PI3K/AKT survival pathway, we used arrays to monitor the presence of phosphorylated MAPKs following *NTSR2* overexpression (Supplementary Figure 2b). Strikingly, *NTSR2* overexpression resulted in a 2–3-fold induction (that is, increase in phosphorylation) of several proteins engaged in survival pathways, including Src, JNK, p38 and Akt (Figures 3a and b). In addition, we observed a decrease in the amount of cytoplasmic nucleosomes, reflecting the level of apoptosis (Figure 3c), following an increase in the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2 (Figures 3d and e). Similar results were obtained when cells were deprived of serum for 24 h, ruling out the possibility that NTSR2 is activated by ligands present in calf serum (Figures 3f–i). Together, these results indicate that *NTSR2* overexpression acts as an oncogene via stimulation of the Src and MAP kinases, as well as by upregulating expression of anti-apoptotic proteins, thereby promoting cell survival and apoptosis resistance, respectively. These results reveal a specific effect of NTSR2 on pro-survival signaling in B-CLL cells.

NTSR2 stimulation is independent of its natural ligand, NTS

We hypothesized that NTSR2 stimulation depended on activation of autocrine and/or paracrine loops following release of NTS, as we showed previously for NTSR1 in normal B lymphocytes.<sup>14</sup> To investigate the role of NTS in modulating apoptosis, we monitored its effect on expression in B lymphocytes derived from B-CLL patients. As observed for NTSR1, the addition of NTS to B-CLL lymphocytes promoted sustained activation of NTSR2 and its downstream cascade, including phosphorylation of Src kinase (Figures 4a and b) and expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL (Figures 4a and c). Following this stimulation, the apoptotic ratio of B-CLL cells decreased significantly (Figure 4d). Because NTSR1 was not expressed in B-CLL, these observations suggest that NTSR2 plays a protective role in these cells.



**Figure 1.** NTSR2, but not NTSR1, is overexpressed in B-CLL. **(a)** Quantitative analyses of *NTSR1* and *NTSR2* mRNA levels in normal B ( $n = 15$ ) and B-CLL ( $n = 30$ ) lymphocytes, normalized against *HPRT*. Data are expressed as mean fold change in expression ( $\pm$  s.e.m.) vs normal B cells. **(b)** Quantitative analyses of *NTSR2* mRNA level in indolent (Indol.) vs progressive (prog.) patients, wild-type (*wt*) vs mutant (*Mut.*) *IGHV*, wild-type (*wt*) vs mutant (deleted, *del.*) p53, CD38 negative (neg.) vs positive (pos.), and absence (no) vs presence of 13q14 deletion (*del.*); values are given in arbitrary units (a.u.). **(c)** Representative analysis of NTSR2 expression from B-lymphocyte lysates from two normal donors (D1, D2) and two B-CLL patients (P1, P2). **(d)** NTSR2 expression, normalized against actin, in normal B ( $n = 6$ ) and B-CLL ( $n = 6$ ) lymphocytes (means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments). Significant *P*-values are indicated in the graphs  $***P < 0.001$ .

To determine whether the autocrine/paracrine interaction of the NTS–NTSR2 complex takes place in B-CLL patients, we performed ELISA to measure the concentration of circulating NTS in plasma from B-CLL patients and HDs. Surprisingly, the concentration of NTS was higher in HD than in B-CLL plasma (80.03 pg/ml vs 48.62 pg/ml,  $P < 0.01$ , Figure 4e). *NTS* mRNA was not detectable (ND) in B-CLL cells, in contrast to normal B cells (Figure 4f), excluding the possibility of autocrine and/or paracrine survival loops triggered by NTS–NTSR2 on the surface of B-CLL cells. Likewise, in both BL-41 and MEC-1 cell lines, overexpression of *NTSR2* for 24 h did not trigger *NTS* expression (Figure 4g), despite sustained NTSR2 activation irrespective of growth factor abundance (Figure 3f).

Taken together, these results suggested that NTSR2 activation must be sustained by an alternative mechanism that does not involve the canonical ligand NTS. We hypothesized (Figure 4h) that, as observed for NTSR1<sup>12,17</sup> and NTSR3/Sortilin,<sup>18,19</sup> NTSR2 can recruit a TKR as an alternative second messenger, thereby inducing its own activation.

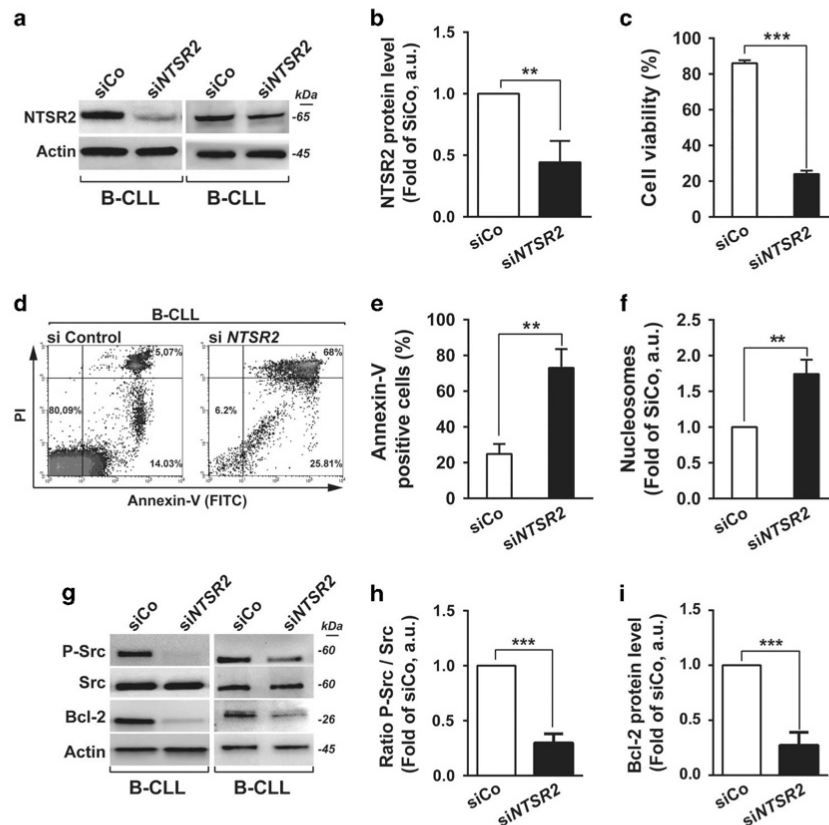
#### NTSR2 interacts with the oncoreceptor TrkB

We previously demonstrated interactions between NTSR3 and epidermal growth factor receptor (EGFR) and TrkB.<sup>18</sup> Interestingly, NTSR1 also interacts with EGFR, although, as mentioned above, neither NTSR1 nor EGFR is detectably expressed in B-CLL cells.<sup>20</sup> Based on our previous findings showing that TrkB and its ligand BDNF are involved in fine-tuning endogenous B-cell survival,<sup>21</sup> as well as in several malignancies<sup>22</sup> including myeloma,<sup>23,24</sup> we speculated that TrkB might serve as a co-receptor for NTSR2.

To explore this possibility, we first compared the levels of *NTRK2* mRNA (encoding TrkB) in B lymphocytes between HDs ( $n = 15$ ) and B-CLL patients ( $n = 30$ ). *NTRK2* was expressed at 30-fold higher levels ( $P < 0.001$ ) in B-CLL cells than in normal B lymphocytes (Figure 5a). Analysis of TrkB expression at the protein level confirmed the mRNA results (Figures 5b and c), consistent with the notion that TrkB could act as a co-receptor of NTSR2.

Confocal analyses revealed that NTSR2 and TrkB colocalized on the B-CLL cell surface (Figure 5d, insets 1-1 and 1-2). Interestingly, this colocalization was more prominent following activation of TrkB by its ligand BDNF (Figure 5d, insets 2-1 and 2-2). These observations were also supported by colocalization analysis based on Mander's overlap coefficient (Figure 5e). Immunoprecipitation (IP) demonstrated that NTSR2 interacted physically with TrkB in B-CLL cells, and this interaction was promoted upon BDNF stimulation, as demonstrated by the presence of phosphorylated TrkB (p-TrkB) in the NTSR2–TrkB immunocomplex (Figure 5f). These interactions were also observed in BL-41 and MEC-1 models (Supplementary Figure 3a) but were absent from normal B lymphocytes (data not shown), suggesting that the NTSR2–TrkB interaction plays a critical role in B-CLL cell homeostasis.

Because BDNF stimulation promoted formation of the NTSR2–TrkB complex in leukemia cells, we analyzed both BDNF expression in B-CLL and circulating BDNF in plasma derived from B-CLL patients or HDs. In contrast to NTS, the concentration of BDNF was higher in B-CLL than in HD plasma (155.2 pg/ml vs 54.58 pg/ml,  $P < 0.01$ , Figure 6a). Likewise, *BDNF* transcript levels were significantly higher in B-CLL than in normal B cells (Figure 6b). Consistent with this, both mature BDNF (mBDNF) and its precursor form (pro-BDNF) were detected in the supernatants of isolated B-CLL lymphocytes, but not normal B cells



**Figure 2.** NTSR2 silencing decreases B-CLL viability and induces apoptosis. (a) Representative western blot of B-CLL lymphocytes transfected with either a non-relevant siRNA (siRNA control, siCo) or a pool of four different siRNAs directed against NTSR2 (siNTSR2). (b) NTSR2 protein level, expressed as fold change vs control (siCo), normalized against actin, in three different B-CLL patients. (c) B-CLL cell viability ( $n=4$ ), expressed as a percentage, 72 h after NTSR2 depletion (siCo vs siNTSR2). (d) Representative fluorescence-activated cell sorting analysis of apoptosis induction, assessed by Annexin V-fluorescein Isothiocyanate/PI dual staining of B-CLL cells ( $n=4$ ) depleted or not for NTSR2. (e) Percentage of apoptotic cells (Annexin V-positive cells) after NTSR2 silencing in B-CLL vs siCo. (f) Apoptotic ratio in B-CLL cells ( $n=5$ ) 72 h after NTSR2 depletion, assessed by cell death ELISA, expressed as fold change vs control (siCo). (g) Representative western blot analysis of p-Src and Bcl-2 expression from B-CLL cell lysates, depleted of NTSR2 or not for 72 h. (h, i) Histogram bars represent the fold change in phosphorylation level of Src or Bcl-2 expression in siNTSR2 cells, normalized against actin, in comparison with siCo. Significant  $P$ -values are indicated in the graphs \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

(Figure 6c), suggesting activation of autocrine and/or paracrine survival loops. As with NTS, the addition of BDNF to B-CLL lymphocytes promoted sustained activation of NTSR2 and its downstream cascade, including phosphorylation of Src kinase and expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL (Figures 6d–f). Likewise, upon TrkB inhibition, NTSR2 failed to maintain both Src Kinases phosphorylation and anti-apoptotic proteins expression thereby suggesting that TrkB and NTSR2 contribute together in the pro-survival signaling pathway (Supplementary Figures 4a–c).

In addition, *in vitro* experiments performed on B-CLL cells following BDNF stimulation revealed a reduced apoptotic ratio in B-CLL, suggesting a protective role for the NTSR2–TrkB–BDNF complex (Figure 6g). To rule out the possibility that the BDNF–TrkB interaction stimulates an autocrine survival loop independently of NTSR2, we performed NTSR2 silencing prior to BDNF stimulation. BDNF failed to protect B-CLL cells from apoptosis triggered by NTSR2 inactivation, suggesting that TrkB is a potential driver for B-CLL survival only when NTSR2 is overexpressed (Figure 6h).

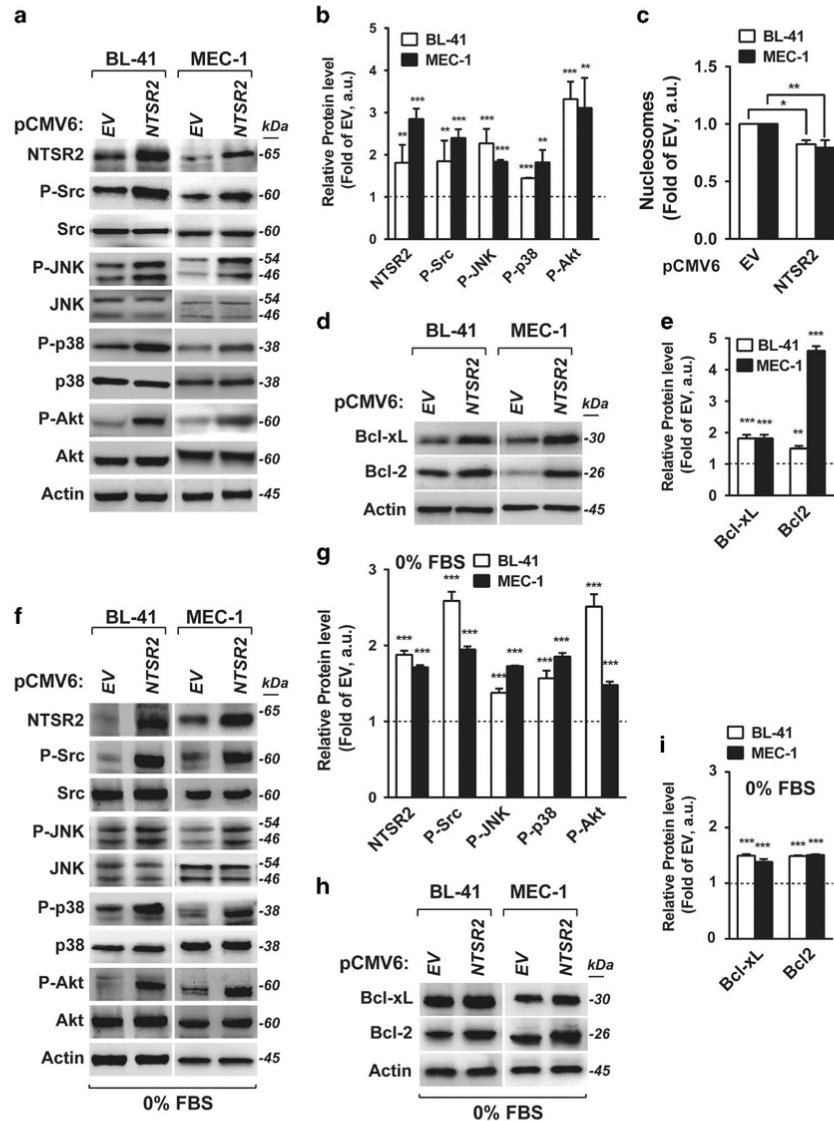
In both MEC-1 and BL-41 cells, NTSR2 overexpression triggered NTRK2 expression (Supplementary Figure 3b). Likewise, in cells

overexpressing NTRK2, we observed an increase in the level of NTSR2 transcripts (Supplementary Figure 3c). These observations are supported by the flow cytometry results demonstrating that NTSR2 and TrkB are co-expressed with at similar levels by B-CLL cells (Figure 5g). Together, these findings indicate that expression of NTSR2 in leukemic patients results from NTRK2 overexpression, and vice versa, providing a molecular mechanism that could explain NTSR2 overexpression in B-CLL.

Overall, these observations suggested that the NTSR2–TrkB complex is at the center of a regulatory network in B-CLL and acts as a conditional oncogene in the presence of BDNF.

NTSR2 is constitutively phosphorylated both in B-CLL cells and model cell lines

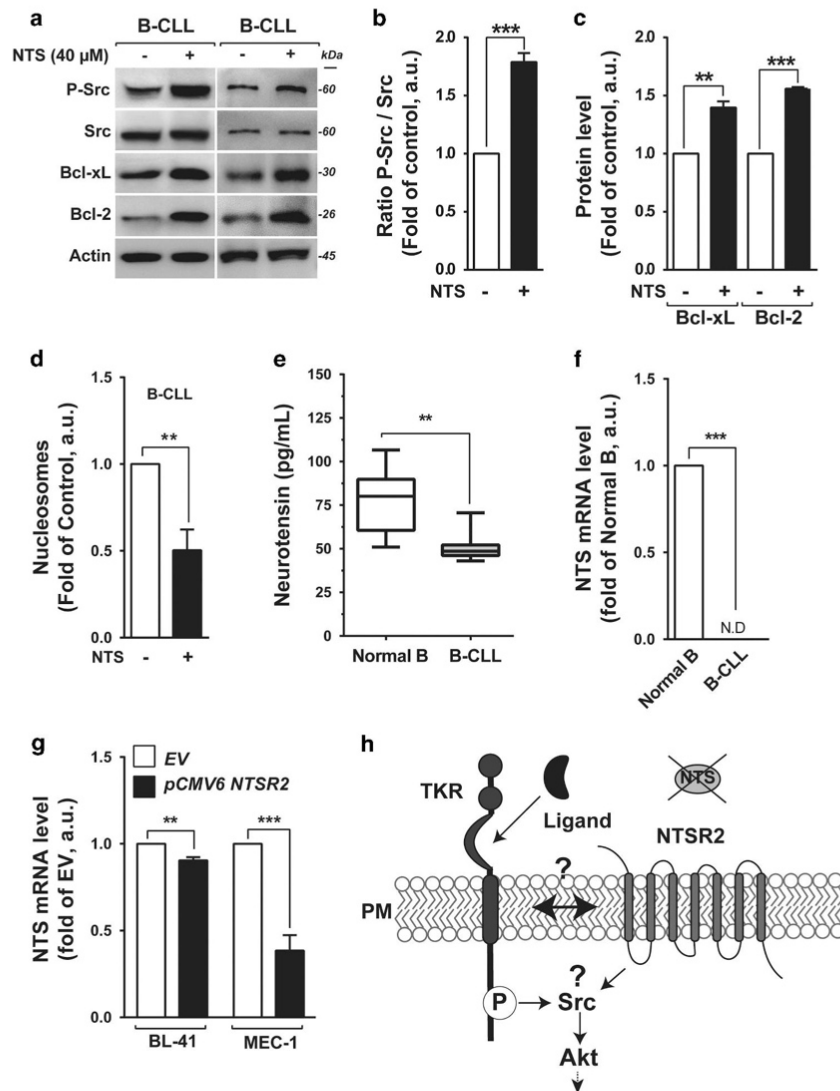
Next, we sought to characterize the activation of NTSR2 through the recruitment of  $G_i\alpha$  proteins, which have been implicated in the activities of several GPCRs such as those observed in immune cell activation.<sup>5</sup> To this end, we studied the effect of pertussis toxin (PTX), which interferes with the interaction of  $G_i$  protein subunits of the  $G_i$  family (isoforms  $G_i\alpha1$ ,  $G_i\alpha2$  and  $G_i\alpha3$ ).<sup>5</sup> Interestingly, upon



**Figure 3.** NTSR2 overexpression induces cell survival signaling pathways. **(a,b)** Western blot analysis of NTSR2, *Src*, *SAPK/JNK*, *p38MAPK*, and *Akt* expression from lysates of BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 (pCMV6-NTSR2) or empty vector (EV) cultured for 24 h post-transfection in basal conditions (10% fetal bovine serum). **(c)** Apoptotic ratio following NTSR2 overexpression for 24 h, assessed by cell death ELISA, expressed as fold change vs empty vector (EV). **(d, e)** Representative western blot analysis of *Bcl-xL* and *Bcl-2* expression in BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 for 24 h. **(h, i)** Fold change in *Bcl-xL* or *Bcl-2* expression in BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 for 24 h, normalized against actin, in comparison with EV. **(f–i)** Similar analyses performed in cells deprived of serum for 24 h. Significant *P*-values are indicated in the graphs \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

PTX treatment, BDNF stimulation failed to maintain *Src* phosphorylation in NTSR2-overexpressing MEC-1 cells (Figures 7a and b). Likewise, *Src* phosphorylation was reduced in the presence of K252a, a *TrkB* inhibitor (Figures 7a and b), suggesting that activation of *Src* upon BDNF stimulation depends on G-protein recruitment and *TrkB* activation. Accordingly, we next investigated the ability of NTSR2 to recruit *Gα* proteins upon stimulation with BDNF, in comparison with its natural ligand NTS. Indeed, IP performed on MEC-1 cells overexpressing NTSR2 indicated that *Gα 1/2* proteins interacted physically with NTSR2, and that this interaction was strengthened upon BDNF stimulation, as also

observed upon NTS treatment (Figure 7c), suggesting that BDNF can trigger recruitment of *Gα 1/2*. In addition, we detected a physical interaction between *Gα 1/2* and NTSR2 in isolated B-CLL lymphocytes (Figure 7d). In the B-CLL, *Gα 1/2* was recruited more efficiently after stimulation with BDNF than with NTS, probably reflecting a stronger tropism for BDNF, which is more highly expressed than NTS in B-CLL cells (Figure 4f). Likewise, in the absence of stimulation, the first patient exhibited strong recruitment of *Gα 1/2*, suggesting a potential difference in the concentration of mBDNF produced and released by B-CLL cells, as observed previously (Figure 6c). Together, these results suggest



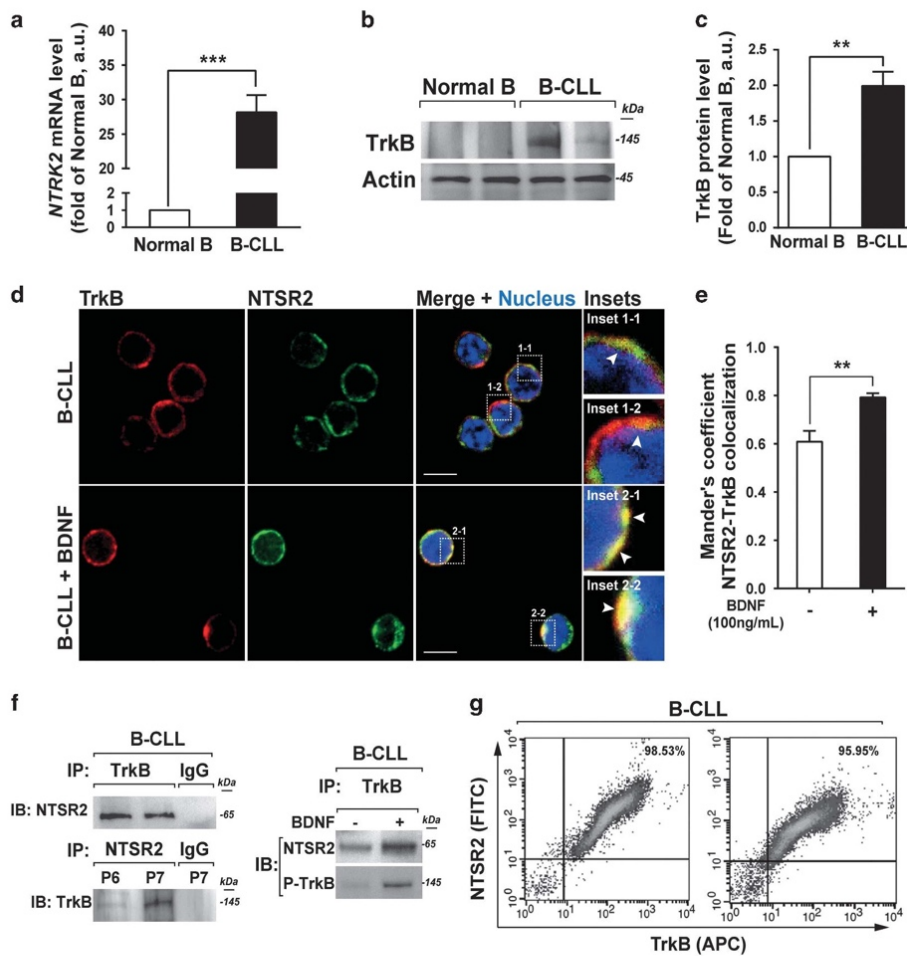
**Figure 4.** Exogenous neurotensin (NTS) maintains cell survival pathways in B-CLL. **(a)** Representative western blot of p-Src, Bcl-xL and Bcl-2 expression in B-CLL cells after addition of neurotensin (40  $\mu$ M) for 24 h. **(b,c)** Expression levels of P-Src **(b)**, Bcl-xL and Bcl-2 **(c)** represented as, respectively, the ratio of phosphorylated Src vs pan-Src protein and the ratios of Bcl-xL and Bcl-2 to actin. Values are means  $\pm$  s.e.m. of B-CLL, expressed in a.u. ( $n=3$ ). **(d)** Apoptotic ratio in B-CLL in the presence or absence of 40  $\mu$ M NTS for 24 h, assessed by cell death ELISA. Values are proportions of apoptotic cells ( $\pm$  s.e.m.) in three independent experiments from different patients ( $n=3$ ). **(e)** Neurotensin concentration, quantified by ELISA, from B-CLL patient plasma ( $n=22$ , gray boxes), in comparison with healthy donor plasma ( $n=8$ , white boxes). **(f)** Quantitative analysis of *NTSR2* mRNA level in normal B cells ( $n=15$ ) and B-CLL ( $n=30$ ). Data are expressed as mean fold change in expression ( $\pm$  s.e.m.) in comparison with normal B cells. ND: not detectable. **(g)** Quantitative analysis of *NTSR2* mRNA level in BL-41 or MEC-1 transfected with either *NTSR2* expression vector (pCMV6 *NTSR2*) or empty vector (EV). Data are expressed as mean fold change ( $\pm$  s.e.m.) vs empty vector. **(h)** Schematic representation of hypothetical *NTSR2* activation dependent on recruitment of a tyrosine kinase receptor (TKR). Significant *P*-values are indicated in the graphs \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

that *NTSR2* undergoes modifications to sustain its signaling pathways and recruit G-protein subunits.

Given that phosphorylation of *NTSR2* was previously observed in mouse<sup>25</sup> and in human,<sup>26</sup> we investigated whether *NTSR2* is phosphorylated in *NTSR2*-OE cell lines and human B-CLL lymphocytes. We detected *NTSR2* phosphorylation in MEC-1 cells overexpressing *NTSR2*, as well as in B-CLL lymphocytes, and the phosphorylation levels increased upon BDNF stimulation (Figure 7e). In the presence of SR142948A, a competitive inhibitor

of *NTSR2* ligand binding, *NTSR2* phosphorylation was suppressed, supporting the binding of BDNF (Figure 7f). This result agreed with the increase of apoptosis observed in B-CLL exposed to SR142948A (Figure 7g), suggesting that *NTSR2* phosphorylation is crucial for B-CLL cell survival.

Taken together, our findings show that *NTSR2* overexpression induces G $\alpha$  recruitment and *NTSR2* phosphorylation in B-CLL lymphocytes. The colocalization of *NTSR2* with TrkB, which is promoted by the presence of BDNF, indicates that a GPCR



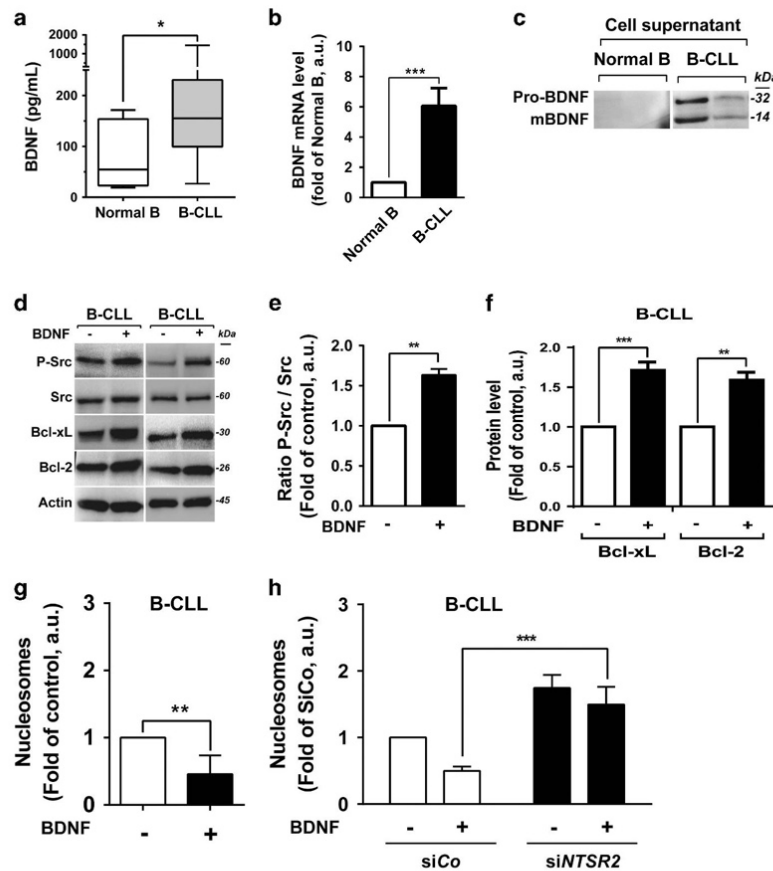
**Figure 5.** NTSR2 interacts with the tyrosine kinase receptor TrkB. (a) Quantitative analysis of the level of *NTRK2* mRNA (encoding TrkB) in normal B ( $n = 15$ ) and B-CLL ( $n = 30$ ) lymphocytes. Data are expressed as mean fold change in *NTRK2* expression ( $\pm$  s.e.m.) vs normal B cells. (b) Representative analysis of TrkB expression from B-lymphocyte cell lysates from two normal donors (D1, D2) or two B-CLL patients (P1, P2). (c) TrkB expression level, normalized against actin, in normal B ( $n = 6$ ) and B-CLL ( $n = 6$ ) cells. Values are means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. (d) Confocal microscopy analysis of NTSR2 (green) and TrkB (red) and their colocalization in B-CLL cells (yellow staining in merged image, insets 1-1 to 2-2) in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml). (e) Mander's overlap coefficient indicating colocalization of NTSR2 and TrkB after BDNF (100 ng/ml) treatment (means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments). (f) After immunoprecipitation (IP) of TrkB and NTSR2 from B-CLL protein lysates, immunocomplexes were immunoblotted (IB) with the indicated antibodies. (g) Representative cytogram showing co-detection of NTSR2 and TrkB by flow cytometry in B-CLL lymphocytes. Significant  $P$ -values are indicated in the graphs  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

signaling platform including both receptors is associated with apoptosis resistance in B-CLL pathogenesis.

## DISCUSSION

Resistance to apoptosis is a hallmark of B-CLL clonal lymphocytes, which are characterized by elevated expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins<sup>27</sup> and sustained activation of pro-survival signaling pathways.<sup>28,29</sup> Several studies have reported various mechanisms associated with B-CLL cell survival, many of which are related to B-cell receptor (BCR) activation. However, despite encouraging results using kinase inhibitors targeting the BCR pathway,<sup>30</sup> the frequency of resistance to this treatment and relapse in CLL patients highlights the deficiencies of current treatment protocols and suggests that other mechanisms are involved in CLL pathogenesis.

Independently of BCR activation, several pro-survival B-CLL growth factors and non-BCR receptors have been implicated in the pathogenesis of B-CLL,<sup>31</sup> including Notch,<sup>32</sup> TKR receptors such as insulin-like growth factor-1 receptor,<sup>33,34</sup> and chemokines and their associated GPCRs.<sup>35-39</sup> However, other GPCRs have not previously been reported to be involved in B-CLL pathogenesis. In this report, we provide the first evidence for the role of another GPCR, NTSR2, in B-CLL resistance to apoptosis (Figure 8). These data are consistent with our previous results showing that NTSR1 and NTSR2 and their common ligand NTS are involved in fine-tuned regulation of normal B-lymphocyte survival.<sup>14</sup> However, in B-CLL lymphocytes, NTSR2 was drastically overexpressed, whereas NTS and NTSR1 were strongly downregulated. Therefore, we investigated the significance of NTSR2 overexpression in the absence of its ligand in the context of B-CLL lymphocyte survival. Our findings revealed that NTSR2 inactivation by either siRNA or a pharmacological



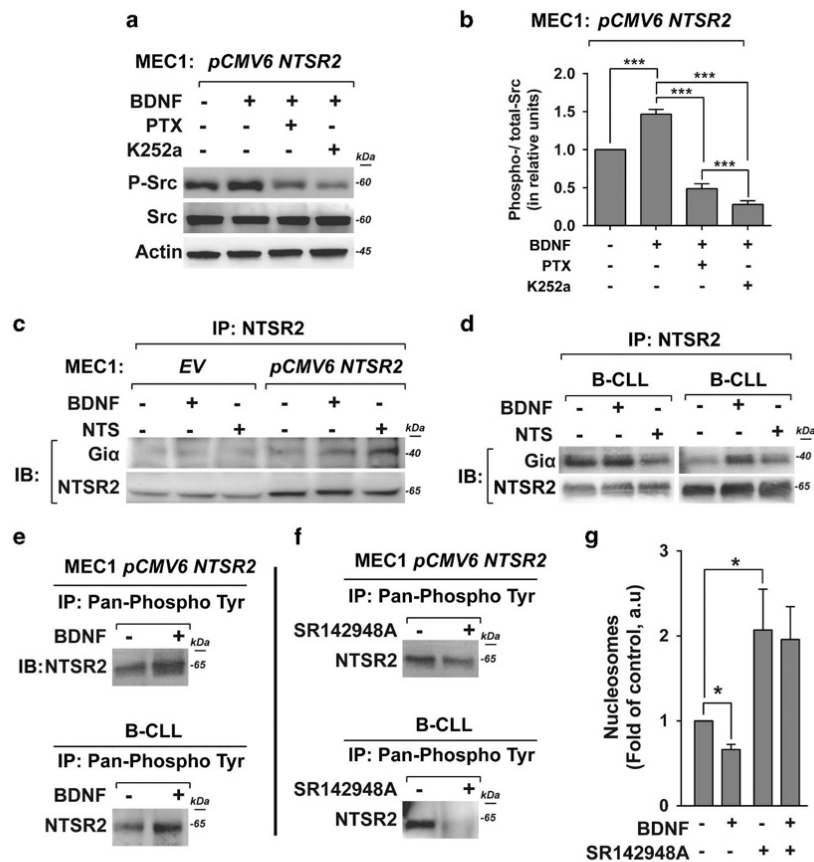
**Figure 6.** Protective role of BDNF against B-CLL apoptosis. **(a)** BDNF concentration, quantified by ELISA, in B-CLL patient plasma ( $n = 17$ , gray boxes) in comparison with healthy donor plasma ( $n = 9$ , white boxes). **(b)** Quantitative analysis of *BDNF* mRNA level in normal B ( $n = 15$ ) and B-CLL ( $n = 30$ ) cells. Data are expressed as mean fold change in expression ( $\pm$  s.e.m.) vs normal B cells. **(c)** Representative western blot analysis of pro-BDNF and mature BDNF (mBDNF) expression in normal B and B-CLL supernatants after 24 h of culture post-isolation. **(d)** Western blot analysis of P-Src, Bcl-xL and Bcl-2 in B-CLL cell lysates from two patients after addition of BDNF (100 ng/ml) for 24 h. **(e, f)** Expression levels of p-Src **(e)**, Bcl-xL and Bcl-2 **(f)** represented as, respectively, the ratio of phosphorylated Src vs pan-Src protein and the ratios of Bcl-xL and Bcl-2 to actin (B-CLL,  $n = 3$ ). Values are means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments, in a.u. **(g, h)** Apoptotic ratio, assessed by cell death ELISA, in B-CLL cells cultured with or without 100 ng/ml BDNF for 24 h (B-CLL,  $n = 4$ ) in the presence or absence of siRNA against NTSR2 or control siRNA. Values are the mean ratio of apoptotic cells ( $\pm$  s.e.m.) from four independent experiments. Significant  $P$ -values are indicated in the graphs \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

inhibitor re-established B-CLL apoptosis (Figure 8, right panel). NTSR2 inactivation was associated with a significant decrease in the levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2, along with reduced activation of Src, which is constitutively phosphorylated in B cells from CLL patients. Strikingly, whereas Bcl-2 protein level changed following NTSR2 stimulation or inhibition, its mRNA level remains unchanged suggesting that Bcl-2 protein undergoes post-translational modifications increasing thereby its stability<sup>40-42</sup> (Supplementary Figure 5). These observations will need to be resolved more deeply in future studies

Because NTS was undetectable in B-CLL lymphocytes, we investigated the possibility that a cross-pathway interaction with another partner was responsible for activating B-CLL cell survival. Like NTS, the growth factor BDNF, a member of the neurotrophin family, is known to participate in B-cell apoptosis resistance via TrkB, its TKR.<sup>21</sup> The concomitant effects of TrkB and NTSR2 on B-CLL lymphocyte survival depended on a physical interaction between these receptors, which was strengthened by BDNF activation (Figure 8, left panel). No such interaction was detected

in normal B lymphocytes. This interaction was supported by mutual regulation of these receptors at the transcriptional level. TrkB expression was upregulated in B-CLL cells, as well as in NTSR2-overexpressing BL-41 or MEC-1 cells. Moreover, experimental overexpression of TrkB in MEC-1 and BL-41 cells induced the upregulation of *NTSR2* mRNA. A cross-pathway interaction between GPCRs and TKRs was previously reported for another NTS receptor, NTSR1 and EGFR/HERs in lung, breast and hepatocarcinomas.<sup>12,17,43</sup> In leukemias or lymphomas, NTSR1 has been characterized in Sezary syndrome and HL-60 cells,<sup>44,45</sup> whereas NTSR2 has rarely been investigated in cancers, with the exception of prostatic cancer.<sup>46</sup>

In this study, we showed that B-CLL survival is linked to the activation of NTSR2, as assessed by G-protein recruitment and phosphorylation (Figure 8, left panel). NTSR2 activation depends on  $G_i\alpha$  protein, as demonstrated by two observations:  $G_i\alpha$  proteins immunoprecipitate with NTSR2 receptor in lymphocytes from B-CLL patients, and PTX decreases cell activation in NTSR2-overexpressing cells.  $G_i\alpha$  protein recruitment in immune cells



**Figure 7.** NTSR2 phosphorylation in B-CLL and recruitment of G $\alpha$ i proteins. **(a)** Representative western blot analysis of Src phosphorylation in MEC-1 cells overexpressing NTSR2 (pCMV6-NTSR2) in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml), pertussis toxin (PTX, 200 ng/ml) or K252a (100 nM) for 24 h. **(b)** Ratio of phosphorylated Src vs pan-Src protein, normalized against actin. Values are means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments in a.u. **(c, d)** After immunoprecipitation (IP) of NTSR2 from MEC-1 cells overexpressing NTSR2 (pCMV6-NTSR2) or not (EV), or from B-CLL cells in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml) or NTS (40  $\mu$ M/ml), the immunocomplexes were immunoblotted (IB) with anti-G $\alpha$ i1/2 antibodies. **(e, f)** After immunoprecipitation (IP) of anti-pan-phosphoprotein was performed on MEC-1 cells overexpressing NTSR2 and B-CLL cells in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml) or SR142948A (67  $\mu$ M), the phosphorylation of NTSR2 was detected by immunoblotting (IB) with anti-NTSR2 antibodies. **(g)** Apoptotic ratio, assessed by cell death ELISA, in B-CLL in the presence or absence of SR142948A (67  $\mu$ M) for 24 h. Values are mean ratios of apoptotic cells ( $\pm$  s.e.m.) of three independent experiments from different patients ( $n = 3$ ). Significant *P*-values are indicated in the graphs \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001.

plays a central role in B-lymphocyte survival, especially in regard to control of Bcl-2 expression, as demonstrated in G $\alpha$ -deficient mouse models showing that downregulated expression of Bcl-2 family proteins.<sup>47</sup> That, decreases the B-1a B-lymphocyte subpopulation,<sup>48</sup> equivalent to B-CLL lymphocytes. However, NTSR has not been previously examined with regard to B-CLL survival. This function was assessed by examining the recruitment and activation of Src, which is constitutively activated in B-CLL lymphocytes. The inhibition of NTSR by either a NTSR pharmacological inhibitor or by siNTSR2 in B-CLL lymphocytes restored B-CLL apoptosis.

According to other TKR-GPCR platform studies,<sup>49–53</sup> NTSR2 activation is associated with the TrkB-NTSR2 complex, an active TKR-GPCR complex that can activate pro-survival signaling pathways including p38MAPK, Erk1/2, JNK and Src. Activation of signaling pathways following BDNF treatment suggests that NTSR2 is activated by TrkB, a finding not previously reported. A TKR-GPCR interaction leading to downstream activation through G $\alpha$ i recruitment was reported for another TKR receptor, IGFR, and another GPCR, CCR5 activated by a chemokine.<sup>52</sup> TKR/GPCR

complex involving neurotrophin receptors was also previously reported for TrkA interacting with LPA (lysophosphatidate receptor) a GPCR receptor, activated by the TrkA ligand NGF (nerve growth factor), whereas GPCR inhibition causes a decrease in MAPK signaling.<sup>54,55</sup>

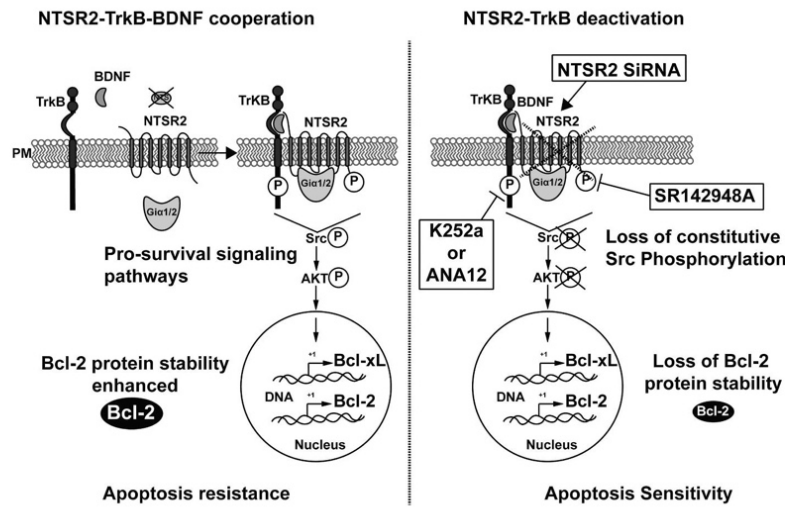
The relationship between anti-apoptotic protein expression, resistance to apoptosis in B-CLL, and NTSR2 overexpression reveals a new mechanism of aberrant B-CLL lymphocyte survival. Knowledge of this mechanism could support the targeting of NTSR2 and its activation, with the ultimate goal of clinical application.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell cultures

BL-41 and MEC-1 cell lines (Leibniz Institute, DSMZ, Germany) were cultured as previously described.<sup>14</sup> Human B lymphocytes from healthy donors blood samples, obtained after approval of the Institutional Ethic Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, were isolated as previously reported.<sup>14,21</sup> Thirty-four B-CLL patients were included in this





**Figure 8.** Model of NTSR2 function in B-CLL survival. In this schematic, NTSR2-TrkB-BDNF acts as a key regulator of B-CLL resistance to apoptosis. The NTSR2-TrkB interaction is strengthened upon BDNF stimulation, and triggers pro-survival pathways via phosphorylation of NTSR2, resulting in activation of the phosphorylation cascade of the Src and Akt kinases, as well as expression of the downstream anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2, leading to B-CLL cell survival and resistance to apoptosis (left panel). NTSR2 inhibition by siRNA-mediated mRNA depletion induces a drastic apoptotic cell death despite the presence of TrkB and BDNF, indicating that TrkB plays a role as a second messenger in NTSR2-mediated apoptotic resistance in B-CLL. NTSR2 deactivation by SR142948A suppresses the ability of NTSR2 to recruit the  $\text{G}\alpha_{1/2}$  subunits upon BDNF stimulation, leading to the suppression of NTSR2 phosphorylation and a decrease in the expression of anti-apoptotic proteins, thereby increasing B-CLL apoptosis (right panel). PM, plasma membrane.

study and approved by Institutional Review Board AC 72-2011-18. B-CLL were isolated from venous blood using the MACSexpress B-CLL Cell Isolation Kit, human (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions.

#### Overexpression and RNA interference

cDNAs encoding NTSR2 and TrkB in pCMV6-XL4 expression vectors were purchased from OriGene Technologies (Herford, Germany). For transient overexpression, cells were transfected using Amaxa Nucleofector 2b (Lonza, Levallois-Perret, France) and the Amaxa Nucleofector Kit-V (Lonza) according to the manufacturer's instructions. For interference assays, B-CLL cells were transfected using INTERFERin (Polyplus transfection, Illkirch, France). In each transfection, 84 ng siRNA against NTSR2 (ON-TARGETplus Human NTSR2 [23620] siRNA - SMARTpool), or siRNA control (ON-TARGETplus Non-targeting pool D-001810-10-20) (Dharmacon, CO, USA), were used.

#### Drugs and treatments

Cultured cells were incubated for 24 h with 40  $\mu\text{M}$  NTS (Calbiochem/Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) or 100 ng/ml human recombinant BDNF (Alomone labs, Jerusalem, Israel). Optimal concentrations of exogenous BDNF and NTS were determined previously.<sup>14,21</sup> The non-peptide NTSR antagonist SR142948A (Tocris Biosciences, Bristol, UK) was used at 67 nM,<sup>56</sup> PTX (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 200 ng/ml<sup>35,57</sup>; TrkB inhibitors were K252a (Alomone Labs) at 100 nM<sup>58,59</sup> or ANA12 (Tocris Biosciences) at 100  $\mu\text{M}$ .<sup>60</sup>

#### Flow cytometry and immunofluorescence

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature (RT). After washes in 1% bovine serum albumin/PBS and incubation with 5% bovine serum albumin/PBS for 30 min at RT, cells were incubated overnight at 4 °C with both rabbit polyclonal anti-NTSR2 and mouse anti-TrkB diluted in PBS/1% bovine serum albumin. After washing, samples were incubated with 1 mg/ml Alexa Fluor 488- or 594-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG Ab (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at RT. After washes, cells were suspended in 500  $\mu\text{l}$  of PBS and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) mounted in mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) and

observed under a confocal microscope (Carl Zeiss, LSM 880, Oberkochen Germany).

#### Western blots

Proteins obtained as described previously<sup>58</sup> were blotted onto polyvinylidene fluoride membrane (Calbiochem/Merck Millipore) and incubated with following antibodies: rabbit anti-NTSR-1 (ANT-015), rabbit anti-NTSR-2 (ANT-016), Alomone Labs; rabbit anti-Bcl-2 (sc-783, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); rabbit anti-Bcl-xL (#27645), rabbit anti-phospho-Akt (Ser473) (#4060S), mouse anti-Akt (pan; #2920S), rabbit anti-phospho-Src family (Tyr416; #6943S), rabbit anti-Src (#2108S), rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; #9211S), rabbit anti-p38 MAPK (#8690S), rabbit anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185; #4668S), and rabbit anti-SAPK/JNK (#9252), all from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); mouse anti-G $\alpha_{1/2}$  antibody (06-236, Calbiochem/Merck Millipore); and anti-actin (A5441, Sigma-Aldrich). After washing (tris-buffered saline/0.1% Tween-20), the immunoreactions were detected by incubation for 2 h at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab against mouse or rabbit Ig (P0447 and P0448, respectively, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), revealed with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore). Western blot were detected using Bioimaging Systems (GeneSnap and GeneTool; Syngene, Cambridge, UK). Densitometric analyses were performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

#### Immunoprecipitation

Immunoprecipitation were conducted as described previously.<sup>58</sup> For IP assays, rabbit anti-NTSR-2 (ANT-016, Alomone Labs), mouse anti-TrkB (MAB3971, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and mouse anti-phosphotyrosine antibody clone 4G10 (05-321, Calbiochem/Merck Millipore) were used along with 50  $\mu\text{l}$  of protein A Sepharose (Sigma-Aldrich), and samples were incubated overnight at 4 °C. After centrifugation, the pellets were washed three times with IP buffer,<sup>58</sup> and then resuspended in 30  $\mu\text{l}$  of SDS-PAGE sample buffer containing DTT (50 mM) and analyzed by SDS-PAGE as described above for western blotting.

#### Analysis of cell viability and apoptosis

Cell viability was assessed using Trypan Blue exclusion method.<sup>61</sup> Apoptosis was evaluated using either the PI/Annexin V-fluorescence

Table 1. Primers and probes sequences				
Names		Sequences	Length (pb)	GenBank Reference
BDNF	Forward	5'-GGCTATGTGGAGTTGGCATT-3'	123	NM_170735.5
	Reverse	5'-CAAACGAAGGCCTCTGAAG-3'		
	Probe	5'-ATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAG-3'		
Neurotensin	Forward	5'-TGACCAATATGCATACATCAAAGA-3'	105	NM_006183.4
	Reverse	5'-TAATTGAACAGCCAGCTG-3'		
	Probe	5'-CATGTTCCCTCTTGGAAAGATGACTCTGCTA-3'		
NTSR1	Forward	5'-CGCCTCATGTTCTGCTACAT-3'	113	NM_002531.2
	Reverse	5'-TAGCTCAGCTCCACCATCAA-3'		
	Probe	5'-AGCAGTGGACTCCGTTCTCTATGACTTCT-3'		
NTSR2	Forward	5'-ATCCAGGTGAATGTGCTGGT-3'	114	NM_012344.3
	Reverse	5'-CCAAGTGCCGCTCACTTCTA-3'		
	Probe	5'-ACTAAGCTTTCTGAATGGGGTCACAGT-3'		
TrkB-FL	Forward	5'-CTGGTGAATAATCGGGGACT-3'	137	NM_006180.4
	Reverse	5'-AGGAAATTCACGACGGAAAG-3'		
	Probe	5'-TGTCACAGCTGACTACTACAGGGTCGGTG-3'		
BCL2	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assay/Catalogue number 4331182		81	NM_000633.2
HPRT	HPRT1 Control mix, Applied Biosystems, TaqMan, VIC Catalogue number 4326321E			NM_000194.1

isothiocyanate double staining method as described previously<sup>62</sup> or the Cell Death Detection ELISA PLUS kit (Roche, Basel, Switzerland) colorimetric assay according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were transfected either with plasmids or siRNA as described above and cultured with or without exogenous BDNF or NTS for 24 additional hours in a 96-multiwell plate ( $5 \times 10^4$  cells/well). Absorbance values were measured at 405–490 nm with an ELISA reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The absorbance obtained in controls was normalized to a value of 1, as previously described.<sup>16</sup>

#### RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR

RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR analyses were performed as previously described.<sup>14</sup> Primers and probes sequences used in this study are summarized in Table 1.

#### Plasma NTS and BDNF quantification

Plasma BDNF and NTS levels were measured using commercial ELISA kits: BDNF E<sub>max</sub> ELISA ImmunoAssay System (Promega, WI, USA) and Human Neurotensin, NT ELISA Kit (CUSABIO Life Science, College Park, MD, USA). All assays were performed in triplicate, and results are expressed in pg/ml.

#### Data treatments and statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's *post hoc* test using the StatView 5.0 software (Abacus Concepts, Piscataway, NJ, USA). *P*-values < 0.05 were considered significant. Mean and s.e.m. values were obtained from at least three independent experiments.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported and funded by grants from the Limousin regional council, La Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie) from Limoges.

#### REFERENCES

- Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002; **21**: 3459–3474.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**: 804–815.
- Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 1403–1412.

- Liu Y, An S, Ward R, Yang Y, Guo X-X, Li W et al. G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett* 2016; **376**: 226–239.
- Kehrl JH. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 1998; **8**: 1–10.
- Kehrl JH. The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gai-mediated signaling in immunity. *Biochem Pharmacol* 2016; **114**: 40–52.
- Barragán M, Bellosillo B, Campàs C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2002; **99**: 2969–2976.
- Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, Vargas JA, Sánchez A, Martín-Saavedra FM et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004; **18**: 1391–1400.
- Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 79–94.
- Mazella J, Zsürger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D et al. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26273–26276.
- Somaï S, Gompel A, Rostène W, Forgez P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**: 482–488.
- Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T et al. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 2014; **5**: 8252–8269.
- Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 2011; **93**: 1369–1378.
- Saada S, Marget P, Fauchais A-L, Lise M-C, Chemin G, Sindou P et al. Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol* 2012; **189**: 5293–5303.
- Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 2004; **91**: 355–358.
- Frade JM, Rodríguez-Tébar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; **383**: 166–168.
- Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O et al. Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* 2014; **5**: 8235–8251.
- Wilson CM, Naves T, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloué F et al. Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci* 2014; **127**: 3983–3997.
- Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloué F et al. The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neuro Disord Drug Targets* 2014; **13**: 1354–1365.
- Dielschneider RF, Xiao W, Yoon J-Y, Noh E, Banerji V, Li H et al. Gefitinib targets ZAP-70-expressing chronic lymphocytic leukemia cells and inhibits B-cell receptor signaling. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1439.
- Fauchais A-L, Lalloué F, Lise M-C, Boumediene A, Preud'homme J-L, Vidal E et al. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* 2008; **181**: 3027–3038.

Oncogene (2018) 756–767

- 22 Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009; **15**: 5962–5967.
- 23 Pearce RN, Swendeman SL, Li Y, Rafii D, Hempstead BL. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 2005; **105**: 4429–4436.
- 24 Ai L-S, Sun C-Y, Wang Y-D, Zhang L, Chu Z-B, Qin Y *et al*. Gene silencing of the BDNF/TrkB axis in multiple myeloma blocks bone destruction and tumor burden in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2013; **133**: 1074–1084.
- 25 Martin S, Vincent J-P, Mazella J. Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *J Cell Sci* 2002; **115**: 165–173.
- 26 Rajmakers R, Kraiczek K, de Jong AP, Mohammed S, Heck AJR. Exploring the human leukocyte phosphoproteome using a microfluidic reversed-phase-TiO<sub>2</sub>-reversed-phase high-performance liquid chromatography phosphochip coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem* 2010; **82**: 824–832.
- 27 Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S *et al*. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998; **91**: 3379–3389.
- 28 Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P *et al*. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007; **21**: 110–120.
- 29 Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; **111**: 846–855.
- 30 Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012; **120**: 1175–1184.
- 31 Ghosh AK, Kay NE. Critical signal transduction pathways in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013; **792**: 215–239.
- 32 Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K *et al*. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009; **113**: 856–865.
- 33 Saiya-Cork K, Collins R, Parkin B, Ouilllette P, Kuizon E, Kujawski L *et al*. A pathobiological role of the insulin receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011; **17**: 2679–2692.
- 34 Yaktapour N, Übelhart R, Schüler J, Aumann K, Dierks C, Burger M *et al*. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **122**: 1621–1633.
- 35 Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; **94**: 3658–3667.
- 36 Möhle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 1999; **13**: 1954–1959.
- 37 Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, Deckert M *et al*. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 2007; **26**: 7081–7091.
- 38 Schröttner P, Leick M, Burger M. The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann Hematol* 2010; **89**: 437–446.
- 39 Drost AC, Seitz G, Boehmler A, Funk M, Norz KP, Zipfel A *et al*. The G protein-coupled receptor CysLT1 mediates chemokine-like effects and prolongs survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; **53**: 665–673.
- 40 Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1886–1896.
- 41 Rooswinkel RW, van de Kooij B, de Vries E, Paauwe M, Braster R, Verheij M *et al*. Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* 2014; **123**: 2806–2815.
- 42 Tomasi ML, Ryoo M, Ramani K, Tomasi I, Giordano P, Mato JM *et al*. Methionine adenosyltransferase a2 sumoylation positively regulate Bcl-2 expression in human colon and liver cancer cells. *Oncotarget* 2015; **6**: 37706–37723.
- 43 Wu Z, Galmiche A, Liu J, Stadler N, Wendum D, Segal-Bendirdjian E *et al*. Neurotensin regulation induces overexpression and activation of EGFR in HCC and restores response to erlotinib and sorafenib. *Cancer Lett* 2017; **388**: 73–84.
- 44 Magazin M, Poszepczynska-Guigné E, Bagot M, Boumsell L, Pruvost C, Chalon P *et al*. Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 111–118.
- 45 Choi SY, Chae HD, Park TJ, Ha H, Kim KT. Characterization of high affinity neurotensin receptor NTR1 in HL-60 cells and its down regulation during granulocytic differentiation. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1050–1056.
- 46 Swift SL, Burns JE, Maitland NJ. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res* 2010; **70**: 347–356.
- 47 Ohman L, Franzén L, Rudolph U, Birnbaumer L, Hörnquist EH. Regression of Peyer's patches in G alpha i2 deficient mice prior to colitis is associated with reduced expression of Bcl-2 and increased apoptosis. *Gut* 2002; **51**: 392–397.
- 48 Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Spicher K, Su TT, Birnbaumer L *et al*. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol* 2003; **170**: 1707–1715.
- 49 Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, De Marinis M, Tafuri D, Cinelli M *et al*. Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 19700–19728.
- 50 El-Shewy HM, Johnson KR, Lee M-H, Jaffa AA, Obeid LM, Luttrell LM. Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2006; **281**: 31399–31407.
- 51 Delcourt N, Bockaert J, Marin P. GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**: 602–607.
- 52 Mira E, Lacalle RA, González MA, Gómez-Moutón C, Abad JL, Bernad A *et al*. A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep* 2001; **2**: 151–156.
- 53 Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG *et al*. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 2001; **291**: 1800–1803.
- 54 Moughal NA, Waters C, Sambi B, Pyne S, Pyne NJ. Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell Signal* 2004; **16**: 127–136.
- 55 Moughal NA, Waters CM, Valentine WJ, Connell M, Richardson JC, Tigyi G *et al*. Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells. *J Neurochem* 2006; **98**: 1920–1929.
- 56 Vita N, Oury-Donat F, Chalon P, Guillemot M, Kaghad M, Bachy A *et al*. Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 1998; **360**: 265–272.
- 57 Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; **110**: 3316–3325.
- 58 De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, Saada S, Neves T, Guillaudeau A *et al*. p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7**: 34480–34497.
- 59 Sun C-Y, Chu Z-B, She X-M, Zhang L, Chen L, Ai L-S *et al*. Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma. *Int J Cancer* 2012; **130**: 827–836.
- 60 Cazorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 1846–1857.
- 61 Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; **111**: A3.B.1–3.
- 62 Bellanger C, Dubanet L, Lise M-C, Fauchais A-L, Bordessoule D, Jauberteau M-O *et al*. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* 2011; **6**: e27213.



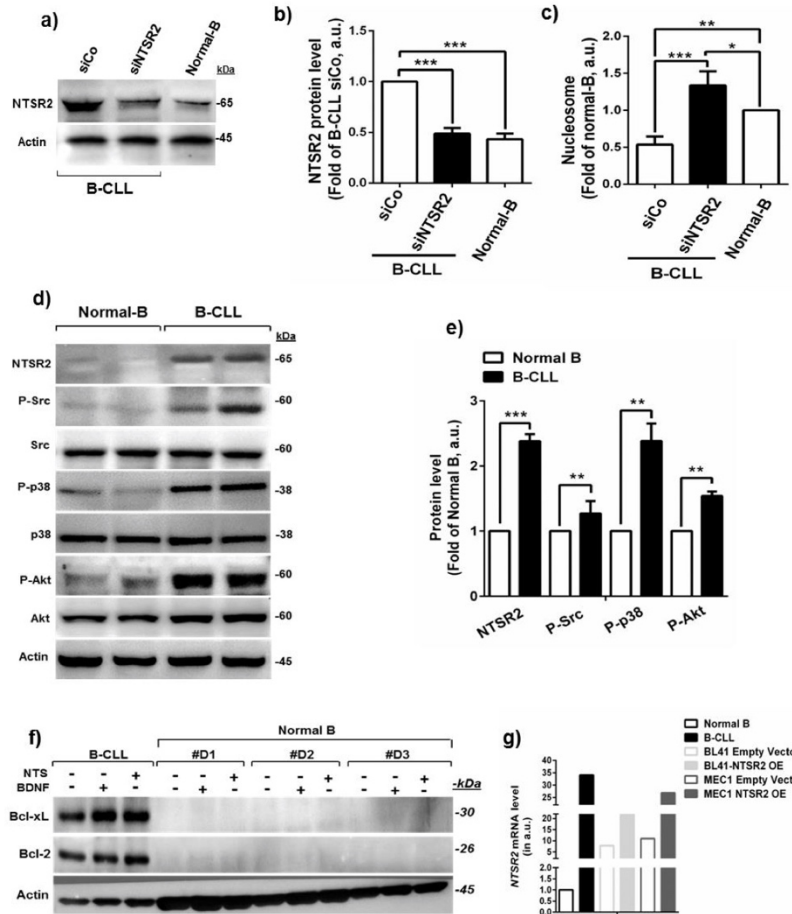
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2018

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Oncogene (2018) 756–767

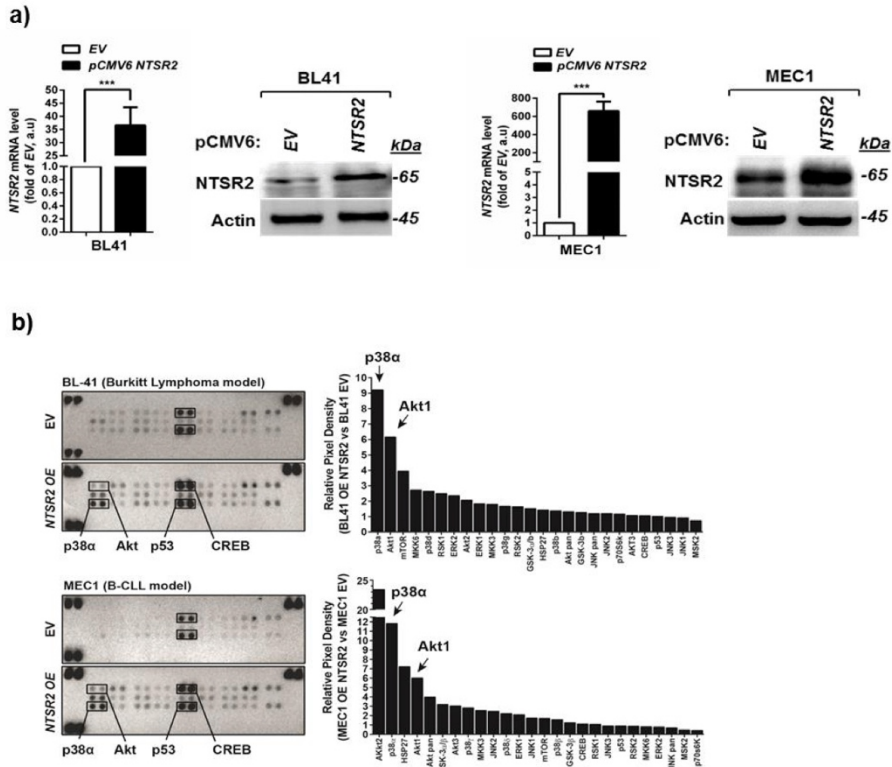
## Supplementary Figure 1



### Supplementary Figure 1. Survival signaling pathways in B-CLL and normal B cells

**(a)** Western blot of NTSR2 expression from B-CLL cell lysates, depleted of *NTSR2* or not for 72 h vs. Normal B cells. **(b)** histograms: fold change in NTSR2 expression in siNTSR2 cells, siControl (siCo) and in Normal B, normalized against actin **(c)** Apoptotic ratio (nucleosome) in B-CLL cells (n=3) depleted of *NTSR2* or not for 72 h vs. Normal B (n=3), expressed as fold change vs. control (siCo). **(d, e)** Western blot analysis of NTSR2, Src, p38MAPK, and Akt expression from B-CLL lymphocytes vs. normal B lymphocytes, expressed as mean fold change in expression ( $\pm$  s.e.m.) in comparison with normal B cells. Values: means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments, in arbitrary units (a.u.). **(f)** western blot of Bcl-xL and Bcl-2, comparing B lymphocytes from three normal donors (#D1, #D2, #D3) and one B-CLL patient (#P1). **(g)** *NTSR2* mRNA level in B-CLL lymphocytes (n=30) vs. normal B lymphocytes (n=15), and in BL-41 or MEC-1 cells transfected with NTSR2 expression vector (pCMV6 NTSR2) (n=15) vs. empty vector (EV) (n=15). Data are expressed as mean fold change in expression ( $\pm$  s.e.m.), with the value from normal B cells defined as 1.

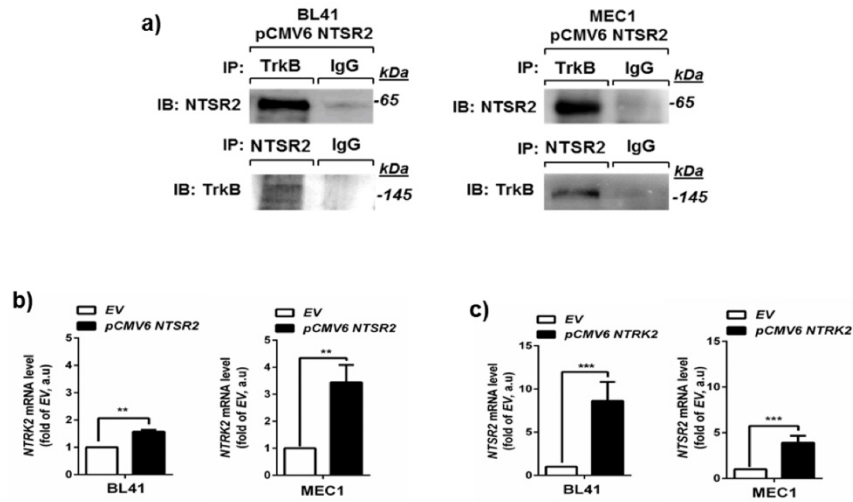
## Supplementary Figure 2



### Supplementary Figure 2. NTSR2 overexpression in BL-41 and MEC-1 cells

**(a)** *NTSR2* mRNA and *NTSR2* protein expression levels in BL-41 or MEC-1 cells transfected with *NTSR2* expression vector (pCMV6 *NTSR2*) or empty vector (EV). Data are expressed as mean fold change ( $\pm$  s.e.m.) vs. empty vector. All experiments were repeated at least three times. **(b)** The signaling pathways activated by *NTSR2* overexpression were investigated using the Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit (R&D Systems). In brief, transfected cells were grown in 24-well plates for 24 h and lysed, and approximately 300  $\mu$ g total protein was analyzed in each assay. Values are expressed as mean fold changes in *NTSR2* expression with respect to cells transfected with the empty vector.

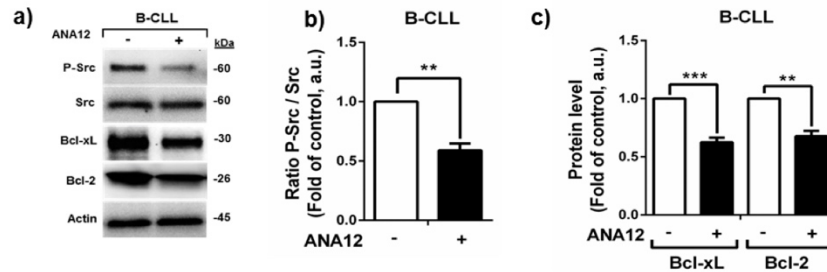
### Supplementary Figure 3



#### Supplementary Figure 3. NTSR2 and TrkB Interactions in BL-41 and MEC-1 cells

**(a)** Immunoprecipitation (IP) of TrkB or NTSR2 from BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 followed by immunoblot (IB) with indicated antibodies. All experiments were repeated at least three times; representative results are shown. **(b)** Quantitative analyses of *NTRK2* mRNA level in BL-41 or MEC-1 cells transfected with NTSR2 expression vector (pCMV6 NTSR2) or empty vector (EV). **(c)** Quantitative analyses of *NTSR2* mRNA level in BL-41 or MEC-1 cells transfected with *NTRK2* expression vector (pCMV6 NTRK2) or empty vector (EV). Values are mean change in *NTSR2* or *NTRK2* expression ( $\pm$  s.e.m.) vs. empty vector. All experiments were repeated at least three times.

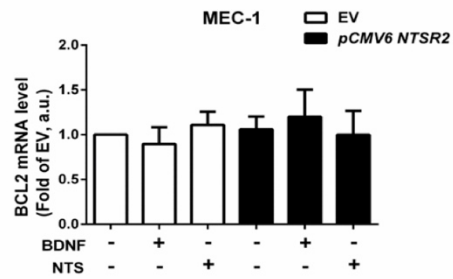
## Supplementary Figure 4



### Supplementary Figure 4. TrkB inhibition and prosurvival pathways

**(a)** Western blot analysis of P-Src, Bcl-xL, and Bcl-2 in B-CLL cell lysates following TrkB inhibition with ANA12 at 100  $\mu$ M for 24 h. **(b, c)** Expression levels of p-Src **(b)**, Bcl-xL, and Bcl-2 **(c)** represented as, respectively, the ratio of phosphorylated Src vs. pan-Src protein and the ratios of Bcl-xL and Bcl-2 to actin (B-CLL, n=3). Values are means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments, in arbitrary units (a.u.).

## Supplementary Figure 5



### Supplementary Figure 5. BDNF or NTS stimulation did not modified *BCL2* mRNA levels in NTSR2-overexpressing MEC-1 cells

Quantitative analyses of *BCL2* mRNA levels in MEC-1 cells transfected with NTSR2 expression vector (pCMV6 NTSR2) or empty vector (EV) after addition of BDNF (100 ng/mL) and neurotensin (40  $\mu$ M) for 24 h. Data are expressed as mean fold change in expression ( $\pm$  s.e.m.) in comparison with EV transfected cells without treatments. Values are means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments, in arbitrary units (a.u.).



### V.3. Préambule article 2

Suite aux résultats obtenus dans le premier article, nous avons voulu étudier les liens éventuels entre la signalisation pro-survie dépendante de NTSR2-TrkB-BDNF et les cellules du microenvironnement tumoral de la LLC. Nous nous sommes particulièrement intéressé à un type cellulaire, les *nurse-like cells* (NLCs), des macrophages de type 2, considérés comme les macrophages associés aux tumeurs de la LLC (Boissard et al., 2015b). Les NLCs sont obtenues *in vitro* par culture à long terme de PBMC de patients atteints de LLC. Il a été précédemment démontré que les NLCs attirent les cellules leucémiques au sein des organes lymphoïdes secondaires par chimiotactisme *via* notamment CXCL12 et CXCL13 puis les protège contre l'apoptose *via* un contact direct et par la sécrétion de BAFF, APRIL et CXCL12 (Boissard et al., 2016; Burger, 2013; Burger et al., 2000; Nishio et al., 2005).

Notre étude a montré que la signalisation par NTSR2-TrkB-BDNF dans les cellules leucémiques semble être promue lorsqu'elles sont co-cultivées avec les NLCs. En effet en présence des NLCs, les expressions de NTSR2 et BDNF sont augmentées, de même que celle de la sortiline, suggérant une augmentation de la sécrétion du BDNF, qui est par ailleurs surexprimé dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de LLC. L'expression de NTSR2, BDNF et sortiline est augmentée dans les cellules de la lignée de LLC Mec-1 stimulées par BAFF, APRIL et CXCL12, suggérant que les NLCs stimulent leur expression par ces facteurs. Enfin, les facteurs solubles CXCL12, BAFF et APRIL n'expliquent pas la totalité de l'effet protecteur des NLCs, mais nos résultats montrent que l'addition du BDNF à ces trois facteurs solubles semble rétablir le même effet que les NLCs. De plus, l'inhibition du BDNF dans les co-cultures NLCs/LB-LLC annule l'effet protecteur des NLCs, qui serait ainsi BDNF-dépendant.

Nos résultats montrent que les NLCs produisent du BDNF et favorisent l'expression de NTSR2-TrkB-BDNF dans les cellules leucémiques, les voies de signalisations ainsi activées pourraient participer à la progression de la LLC au sein du microenvironnement tumoral.

L'ensemble de nos résultats est présenté dans l'article suivant, intitulé « Nurse-Like Cells (NLCs) promote the BDNF/NTSR2-TrkB B-cells pro-survival pathway in CLL ». La soumission de cet article est envisagée pour Mars-Avril 2019. Les résultats manquants avant soumission seront détaillés dans la partie « V.5. Résultats complémentaires et perspectives à court terme ».

## V.4. Article 2

## Nurse-Like Cells (NLCs) promote the BDNF/NTSR2-TrkB B-cells pro-survival pathway in CLL

Hugo Talbot<sup>1</sup>, Sofiane Saada<sup>1</sup>, Thomas Naves<sup>1</sup>, Paul-François Gallet<sup>1</sup>, Nathalie Gachard<sup>2,3</sup>, Julie Abraham<sup>4</sup>, Arnaud Jaccard<sup>3,4</sup>, Danielle Troutaud<sup>1</sup>, Anne-Laure Fauchais<sup>1,5,7</sup>, and Marie-Odile Jauberteau<sup>1,6,7</sup>

<sup>1</sup>Limoges University, Equipe Accueil 3842 CAPTuR, Faculty of Medicine, Limoges Cedex, France; <sup>2</sup>Hematology Laboratory, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France; <sup>3</sup>CNRS-UMR 7276, Limoges University, Limoges Cedex, France; <sup>4</sup>Department of Hematology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France; <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France and <sup>6</sup>Department of Immunology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France.

Correspondence: Professor M-O Jauberteau, EA3842 CAPTuR, Faculté de Médecine, 2, Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

E-mail: hugo.talbot@unilim.fr, m-o.jauberteau-marchan@unilim.fr

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work

### Abstract

B-cell chronic lymphocytic leukemia cells (B-CLL) are resistant to apoptosis, and accumulate in peripheral blood and lymphoid organs of CLL patients. Because current therapies fail to eradicate all of these apoptosis-resistant cells, identification of alternative survival pathways is crucial for the development of novel anticancer therapies. We previously characterized an overexpression of a G-protein-coupled receptor, NTSR2, and a tyrosine kinase receptor, TrkB. These two receptors interact to form a pro-survival signaling platform activated by BDNF, and signaling through kinases Src and Akt. This aberrant signaling pathway is associated with Bcl-2 and Bcl-XL expression and B-CLL apoptosis resistance. In this study, we sought to evaluate the modulation of this NTSR2-TrkB-BDNF signaling pathway by cells of the CLL tumor microenvironment (TME). Nurse-Like Cells (NLCs) are known to attract B-CLL to the TME and protect them against apoptosis, through direct cell contact and secretion of pro-survival cytokines and chemokines CXCL12, BAFF and APRIL. Here we show that in the presence of NLCs, NTSR2-TrkB-BDNF expression is upregulated and Src signaling pathway activated. Furthermore, BDNF is expressed by NLCs and sortilin (a BDNF trafficking regulator) is upregulated both in NLCs and B-CLL co-cultured with NLCs. BDNF protects B-CLL from apoptosis along with CXCL12, BAFF and APRIL, and NLCs-mediated protection is BDNF-dependent. Here, we show that NLCs promote B-CLL resistance to apoptosis through the NTSR2-TrkB-BDNF pro-survival pathway, which might contribute to tumor progression.

## Introduction

In Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), monoclonal CD5<sup>+</sup> mature B-cells, resistant to cell death, are accumulated in peripheral blood, bone marrow and lymphoid tissues<sup>1,2</sup>. Several factors have been identified as implicated in CLL development, including mutations in the immunoglobulin heavy-chain variable region gene (*IGHV*) and genomic alterations, used as prognostic markers for indolent or aggressive disease course<sup>3</sup>. However, no curative treatment, eradicating all apoptosis-resistant B-CLL are currently available. Hence, identification of as-yet-unknown mechanisms involved in B-CLL cell survival pathways could provide new targets for anticancer therapies.

We previously identified an unknown interaction between two receptors at the plasma membrane of circulating B-CLL<sup>4</sup>. The neurotensin receptor 2 (NTSR2), an overexpressed G protein-coupled receptor (GPCR), interacts with the tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB), a tyrosine kinase receptor. This complex which is activated upon stimulation by TrkB ligand, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), activates the Src family of protein kinases (SRC) and the phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathways, which promote the expression of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, Bcl-2 and Bcl-XL<sup>4</sup>. These pathways were found to be constitutively activated in B-CLL and contribute to apoptosis resistance<sup>4-6</sup>.

To further evaluate the contribution of NTSR2-TrkB-BDNF in B-CLL pathogenesis, we sought to investigate the relationship between this signaling complex and the tumor microenvironment (TME) of CLL. In secondary lymphoid organs, such as lymph nodes, cross talk between B cells and TME cells in CLL favors disease progression by promoting B cell growth and drug resistance<sup>7</sup>. The TME of CLL is composed of extracellular matrix, cytokines, chemokines and non-malignant CD4<sup>+</sup> T cells<sup>8</sup>, mesenchymal stromal cells<sup>9</sup> and monocyte-derived nurse-like cells (NLC)<sup>10</sup>. These NLC display a phenotype similar to type 2 macrophages (expression of CD14, CD11b, CD68, HLA class II and CD163) and are considered as the tumor-associated macrophages (TAM) of CLL<sup>11</sup>. Progression of CLL has been associated to NLC infiltration of lymph nodes<sup>12</sup>. *In vitro*, NLC can be obtained by long term cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CLL patients. NLC differentiation is promoted by extracellular high-mobility group box-1 (HMGB1)<sup>12</sup>, and their generation and survival are dependent on colony-stimulating factor-1 receptor signaling<sup>13</sup>. NLCs promote B-CLL cells survival and apoptosis rescue thanks to their CXCL12<sup>10,14</sup>, BAFF

and APRIL<sup>15</sup> productions or by stimulating the release of CCL3 and CCL4 by B-cells<sup>16</sup>. Protection from apoptosis by these soluble factors is limited<sup>10,15</sup>. Moreover, their effects are dependent on the B-CLL/NLC direct contact through LFA-3/CD2 interaction which might be a critical step for the release function of NLCs<sup>17</sup>.

Our results demonstrate that NLCs express BDNF as well as its trafficking regulator sortilin *in vitro*. Upon co-culture with NLCs, BDNF, TrkB and NTSR2 expressions are enhanced in B-CLL cells and Src signaling pathway is activated. This upregulation is correlated to the CXCL12, BAFF and APRIL released by NLCs. While combined exogenous soluble CXCL12, BAFF and APRIL partially protect B-CLL from apoptosis compared to the presence of NLCs, addition of soluble BDNF to the cocktail rescues the NLCs protection levels and survival promotion. Furthermore, NLCs-mediated protection of B-CLL against apoptosis is BDNF-dependent. Taken together, our results show that NLCs promote the NTSR2-TrkB-BDNF pro-survival pathway, which might contribute to tumor progression.

## **Materials and Methods**

### ***Cell cultures***

Thirty B-CLL patients were included in this study that was approved by Institutional Review Board AC 72-2011-18. Peripheral blood mononuclear cells were obtained by ficoll gradient centrifugation (Eurobio). B-CLL were isolated from venous blood using the MACSxpress B-CLL Cell Isolation Kit, human (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions.

NLC were obtained, according to previously described protocol<sup>10</sup>, from high concentration cultures of CLL patients PBMC ( $10^7$ /mL) in RPMI1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS (ID-Bio) and 1% each MEM vitamins, nonessential amino acids, sodium pyruvate, and penicillin-streptomycin (Life Technologies). Non-adherent cells were thoroughly flushed after 14 days of co-culture, NLC were harvested by trypsinization or further used for B-CLL co-culture experiments. B-CLL cells were purified from non-adherent cells obtained after 14 days of co-cultures using the B-CLL Cell Isolation Kit, human (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions.

MEC-1, a human B-CLL cell line (Leibniz Institute, DSMZ, Germany) was cultured as previously described<sup>18</sup>.

### ***Treatments***

Cultured cells were incubated with 100 ng/mL human recombinant CXCL12 (Biolegend, 581202), 2 ng/mL human recombinant BAFF (Biolegend, 559604), 25 ng/mL human recombinant APRIL (Peprotech, 310-10C) or 100 ng/ml human recombinant BDNF (Alomone labs, #B-250). BDNF neutralization was performed using 100 ng/ml anti-BDNF mouse monoclonal antibody (Merck, 35928.11).

### ***Immunofluorescence***

Immunofluorescence staining was performed as previously described<sup>4</sup>. Primary antibodies used were anti-CD14-FITC (Biolegend, clone 63D6), anti-CD68 (Biolegend, clone Y1/82A), anti-CD163 (Biolegend, clone GHI/61), anti-sortilin (Abcam, ab16640) and anti-BDNF (R&D Systems, MAB648). Secondary antibodies were Alexa Fluor 488- or 594-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG Ab (Invitrogen). Slides were observed under a confocal microscope (Carl Zeiss, LSM 880).

### ***Immunohistochemistry***

Lymph nodes included in paraffin blocks were obtained from 10 patients with CLL, 2 benign lymph nodes were used as controls. Lymph nodes were provided by the Tumor Bank of Limoges University Hospital, under protocols approved by the Institutional Review Board (AC N 2007- 34, DC 2008-604, and 72-2011-18).

Immunohistochemical studies were performed as previously described<sup>19</sup> using Envision Kit (Dako). Antibodies used were anti-BDNF (Santa Cruz, clone N-20), mouse isotype control IgG1 (Cell Signaling) and rabbit isotypic control (Sigma-Aldrich). Slides were observed under Hamamatsu NanoZoomer RS (Meyer Instruments) and staining intensity was quantified using the ImageJ software (NIH).

### ***Western blots***

Western blots were realized following previously described protocol<sup>4</sup>. Antibodies used were: rabbit anti-NTSR-2 (ANT-016, Alomone Labs), mouse anti-sortilin (BD Biosciences, clone 48), anti-BDNF (R&D Systems, MAB648), anti-CD68 (Biolegend, clone Y1/82A), anti-CD163 (Biolegend, clone GHI/61), anti-CD206 (Biolegend, clone 15-2), anti-phospho-

Src Tyr-416 (Cell Signaling Technology, #2101), anti-Src (Cell Signaling Technology, #2108) and anti-actin (A5441, Sigma-Aldrich).

### ***Cell apoptosis analysis***

Apoptosis was assessed by cytoplasmic nucleosome release using the enzyme immunoassay Cell Death Detection ELISA kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Absorbance values were measured at 405–490 nm with an ELISA reader (Thermo Fisher Scientific).

Cell death by apoptosis and necrosis was assessed by flow cytometry of Annexin V and Propidium Iodide (PI) stained cells according to previously described protocol<sup>4</sup>.

### ***Microarray data mining***

Transcriptomes obtained with the Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 platform were downloaded from the NCBI repository GEO database. Datasets accession numbers are: GSE42733<sup>20</sup>, analyzing transcriptomes of normal monocytes (n=5) and NLCs obtained from PBMC cultures (n=10); GSE13811<sup>16</sup>, analyzing B-CLL alone (n=9) or in co-culture with NLC (n=9). Probe IDs analyzed are 224818\_at (*SORT1*), 221795\_at (*NTRK2*), 206899\_at (*NTSR2*), 239367\_at (*BDNF*) and 206291\_at (*NTS*).

### ***Data treatment and statistical analysis***

Graphical representations were realized using GraphPad Prism 7 software. Immunohistochemistry and western blot analysis were quantified using the ImageJ software (NIH). Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's post hoc test using the StatView 5.0 software (Abacus Concepts).  $p$ -values  $< 0.05$  were considered significant and are represented as  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$  and  $p < 0.001 = ***$ . Mean and SEM values were obtained from at least three independent experiments.

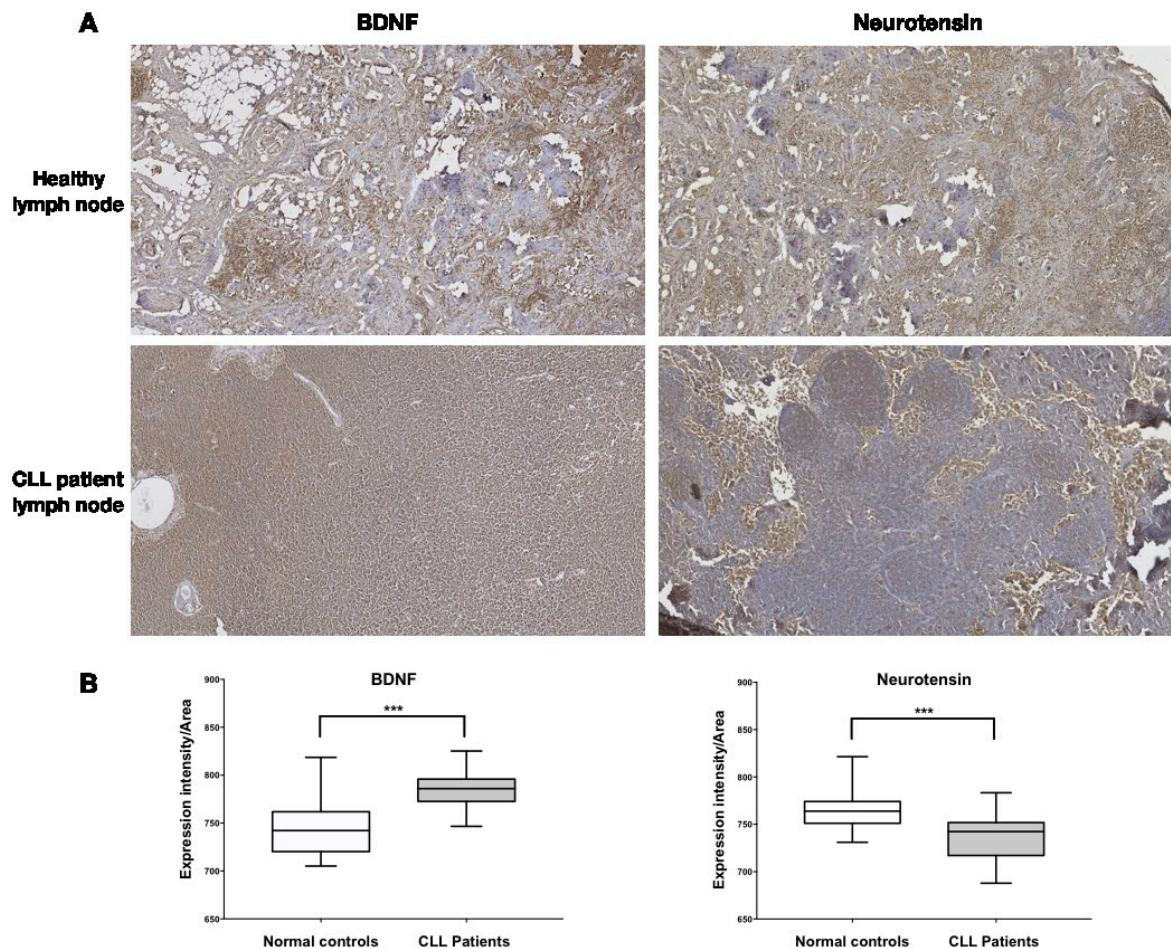
## **Results**

### ***BDNF is overexpressed in CLL patients' lymph nodes***

Based on our previous observation that BDNF is overexpressed in CLL patients sera and in B-CLL cells, and engages in autocrine pro-survival signaling through the NTSR2-TrkB complex in peripheral blood B-CLL cells<sup>4</sup>, we sought to evaluate its expression in lymph nodes of CLL patients, where the TME plays a major role in CLL pathogenesis<sup>7</sup>.

Expression of BDNF was assessed by immunohistochemical staining in control benign lymph nodes (n=2) and CLL lymph nodes (n=4). Results show that BDNF is expressed in both tissues (Figure 1A) and quantification of BDNF intensity shows that its expression is significantly higher in CLL than in control lymph nodes (Figure 1B). NTS expression in was also evaluated. Result show a decrease in NTS expression in patients lymph nodes (Figure 1A-B). Increase of BDNF and decrease of NTS in patients lymph nodes correlate with previously observed expression in CLL patients sera<sup>4</sup>.

BDNF upregulation in lymph nodes suggests an increased BDNF-dependent pro-survival signaling in B-CLL which might contribute to CLL pathogenesis in lymph nodes TME.



**Figure 1 : BDNF expression is higher in lymph nodes of CLL patients than in healthy lymph nodes. (A)** A representative immunohistochemical 3,3'-diaminobenzidine staining of BDNF and neurotensin in healthy lymph nodes (n=2) and B-CLL patients lymph nodes (n=4).

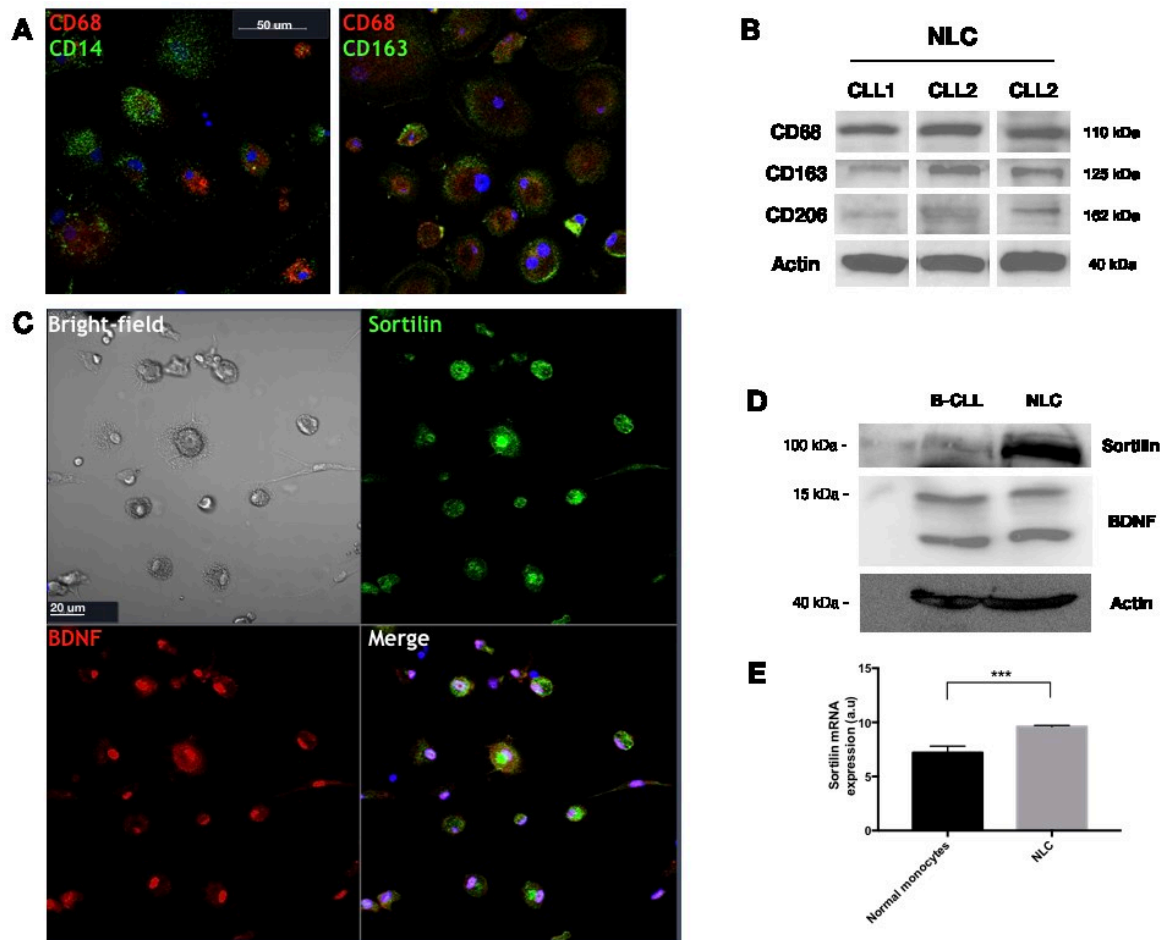


**(B)** Quantification of 3,3'-Diaminobenzidine staining in healthy controls and patient's lymph nodes.

### ***Nurse-like cells express BDNF***

We then sought to characterize if BDNF is solely produced by B-CLL cells or if it is also expressed by cells from the TME. To this end, NLCs were generated from CLL patients PBMCs as previously described<sup>10</sup>. Before further studies, we validated our culture protocol by properly identifying generated cells. Co-expression of CD14, CD68 and CD163 was confirmed by immunofluorescence (Figure 2A), and expression of NLCs protein markers CD68, CD163 and CD206 was detected by western blot analysis (Figure 2B), validating the differentiation of peripheral blood monocytes into NLC.

BDNF expression was assessed both by immunofluorescence (Figure 2C) and western blotting (Figure 2D). Results show that NLCs express BDNF, and expression level is similar to that observed in B-CLL (Figure 2D), suggesting a paracrine pro-survival effect of BDNF secreted by NLCs on top of the autocrine effect previously observed<sup>4</sup>.



**Figure 2 : Nurse-Like Cells express both BDNF and its trafficking regulator Sortilin.** (A) Confocal microscopy analysis of CD14 (green) and CD68 (red) in the left panel, and CD163 (green) and CD68 (red) in Nurse-Like Cells. Nucleus are stained with DAPI (B) Western blot analysis of CD68, CD163 and CD206 expression in NLCs (C) Bright-field (top-left panel) and confocal microscopy analysis of sortilin (green) and BDNF (red), nuclei are stained with DAPI. Fluorescent stainings are merged in the bottom-right panel. (D) Representative western blot analysis of sortilin and BDNF expression in NLCs and B-CLL (E) Expression of sortilin mRNA in normal monocytes (n=5) and NLCs from B-CLL patients (n=10), analysed from Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array, dataset GSE42733.

### *Sortilin is upregulated in Nurse-like cells*

Since sortilin was associated to the BDNF trafficking in B lymphocytes, it plays an important part in the BDNF autocrine survival loop<sup>21</sup>. We evaluated here its expression in NLCs. Immunofluorescence shows that NLCs strongly express sortilin. Staining analysis shows that its localization is mainly perinuclear and diffuse in the cytoplasm (Figure 2C), correlating with the role of sortilin in anterograde transport from the Golgi apparatus to the plasma membrane/extracellular medium<sup>22</sup>. Western blotting experiments show that sortilin is expressed at a higher level in NLCs than in B-CLL, suggesting that sortilin, having a major

function in BDNF secretion, may play other important functions to sustain B-CLL survival processes.

Moreover, Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (accession number GSE42733<sup>20</sup>), revealed a higher sortilin mRNA expression in NLCs than in peripheral blood monocytes (Figure 2E), meaning that this upregulation of sortilin is either acquired by monocytes after their recruitment to the lymph nodes and their interaction with B-CLL and TME cells, or after their differentiation in NLCs.

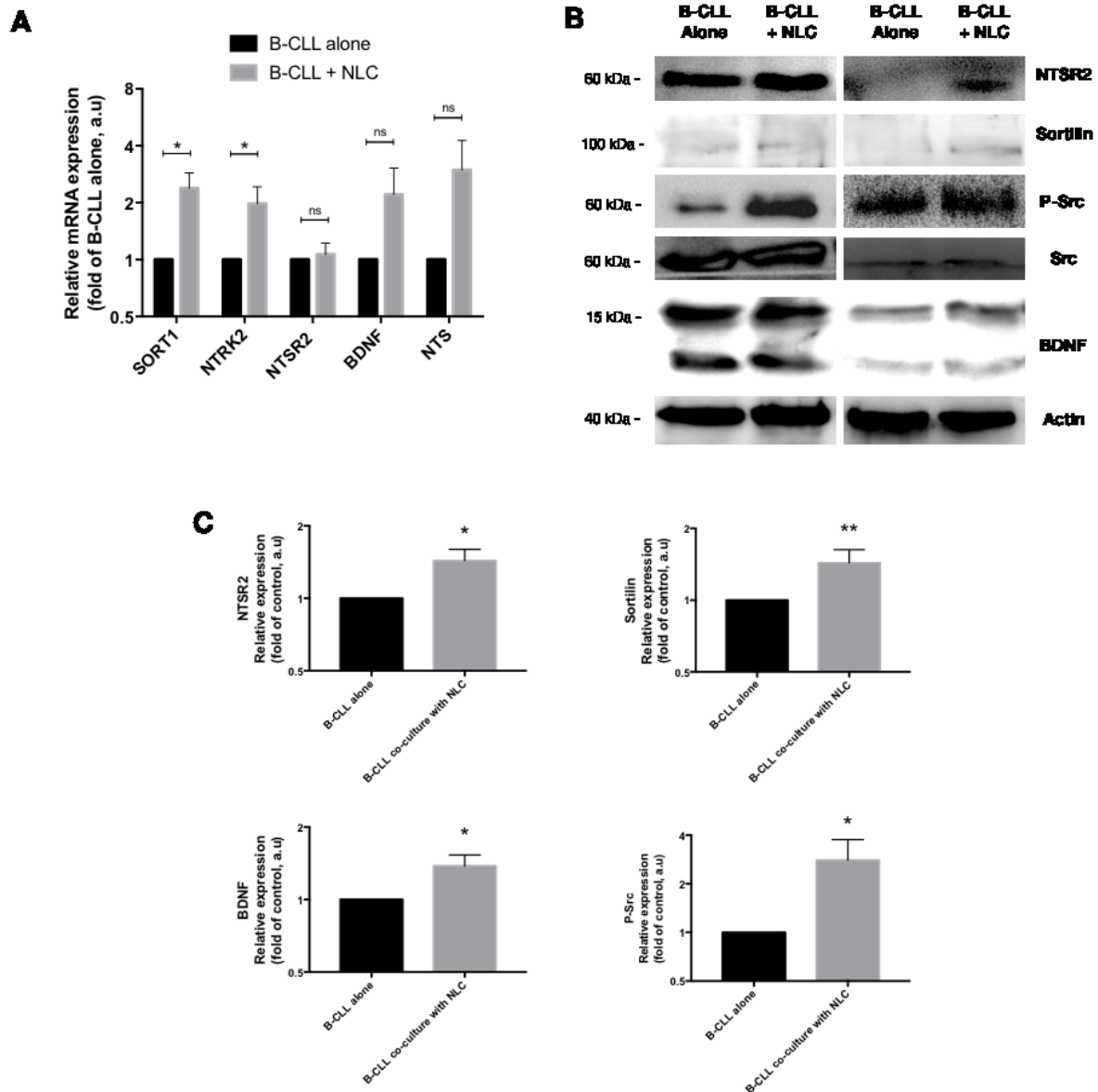
### ***Nurse-like cells increase the expressions of NTSR2, BDNF and sortilin in B-CLL***

We next investigated the effect of NLCs on the NTSR2-TrkB-BDNF survival axis in B-CLL. First, we analyzed results from Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (dataset GSE13811<sup>16</sup>). Relative mRNA expression of *SORT1*, *NTRK2*, *NTSR2*, *BDNF* and *NTS* in B-CLL co-cultured for 14 days with NLCs (n=9) were compared to B-CLL cells (n=9) purified from the same patients' blood (Figure 3A). Results show that NLCs significantly upregulate *SORT1* (sortilin gene) and *NTRK2* (TrkB gene) mRNA expression, while *NTSR2* mRNA expression remain unchanged. *BDNF* mRNA levels are also increased, although results are not statistically significant due to high patients heterogeneity. The same observation was made for neurotensin (*NTS*) mRNA.

To confirm those results, purified B-CLL were either cultured alone or in co-culture with NLCs for 48h, and protein expression was assessed by western blotting on B-CLL (Figure 3B-C). Correlating with mRNA observations, in the presence of NLCs, sortilin and BDNF expressions were upregulated. In contrast to mRNA levels analysis, NTSR2 protein expression was upregulated in presence of NLCs.

Src survival signaling pathway activation was assessed by western blot detection of the Tyr-416 phosphorylated form of Src. Phosphorylation of Src is increased in the presence of NLCs (Figure 3B-C), suggesting signaling through NTSR2-TrkB-BDNF.

Altogether, these data suggest that NLCs promote the upregulation of all the proteins involved in the pro-survival NTSR2-TrkB-BDNF axis. Sortilin and BDNF upregulation could enhance secretion of BDNF by B-CLL cells, while NTSR2 and TrkB upregulation might increase pro-survival signaling.



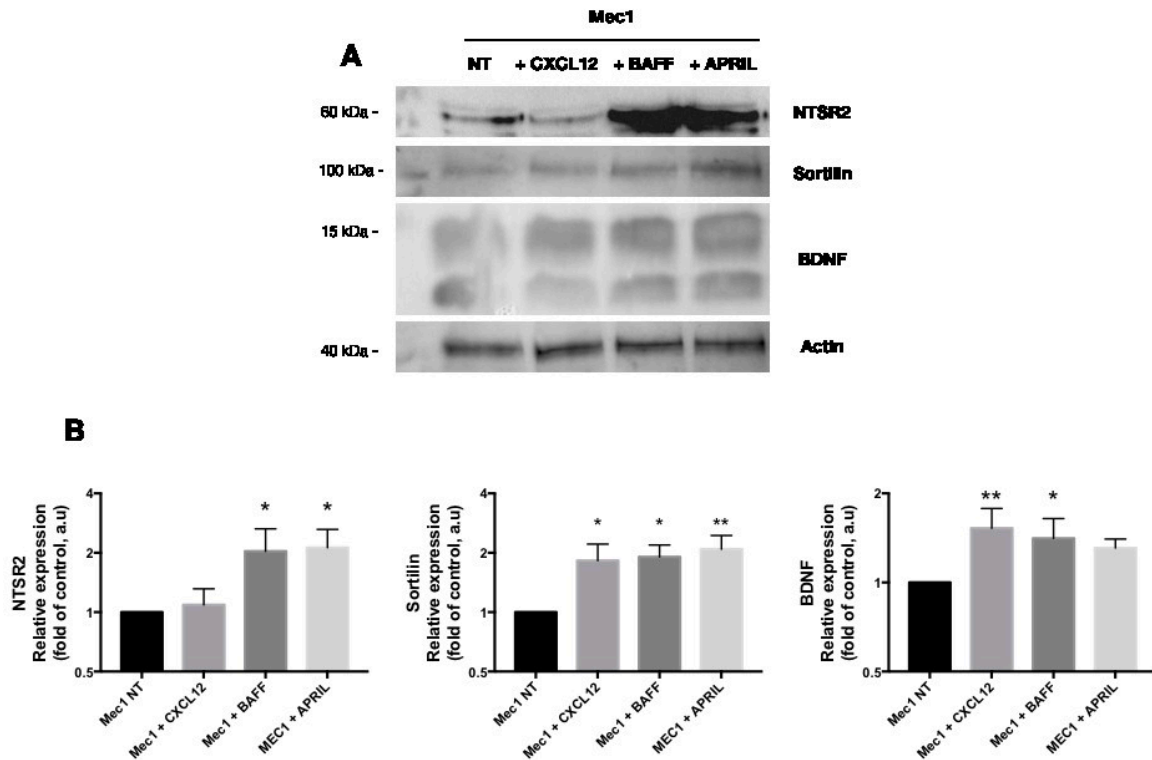
**Figure 3 : B-CLL expression levels of NTSR2, BDNF and sortilin are influenced by the presence of NLCs, and Src survival signaling pathway is activated by NLCs. (A)** Relative mRNA expression of *SORT1*, *NTRK2*, *NTSR2*, *BDNF* and *NTS* in B-CLL co-cultured for 14 days with NLC (n=9), compared to B-CLL cells (n=9) purified from the same patients' blood. Analyses from Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array, dataset GSE13811. **(B)** Representative western blot analysis of NTSR2, sortilin, BDNF, Src and p-Src from B-CLL cultured alone or with NLC for 48h, results for two different patients are displayed. **(C)** Quantification of western blot analysis from 5 different B-CLL patients.

### ***Exogenous CXCL12, BAFF and APRIL upregulate NTSR2, BDNF and sortilin expression***

In order to identify the origin of NTSR2, sortilin and BDNF upregulation, we investigated the impact of B-cells environment on their expression. Thus, we treated Mec-1 (a CLL cell line) cells with exogenous chemokines/cytokines CXCL12, BAFF and APRIL and

further evaluated protein expression by western blotting (Figure 4A-B). BDNF and sortilin expressions were upregulated by all three factors, while NTSR2 expression was only stimulated by BAFF and APRIL but not by CXCL12.

As BAFF, APRIL and CXCL12 are secreted by NLCs, we hypothesize that the previously described upregulation of NTSR2, BDNF and sortilin in the presence of NLC might be mediated by these three soluble factors (among others).



**Figure 4 : Upregulation of NTSR2, BDNF and Sortilin expression is mediated by BAFF, APRIL and CXCL12.** A) Representative western blot analysis of NTSR2, sortilin and BDNF from CLL cell line Mec1 cultured for 48h without treatment or in the presence of CXCL12 (100 ng/mL), BAFF (2 ng/mL) or APRIL (25 ng/mL). B) Quantification of western blot analysis from 5 independent experiments.

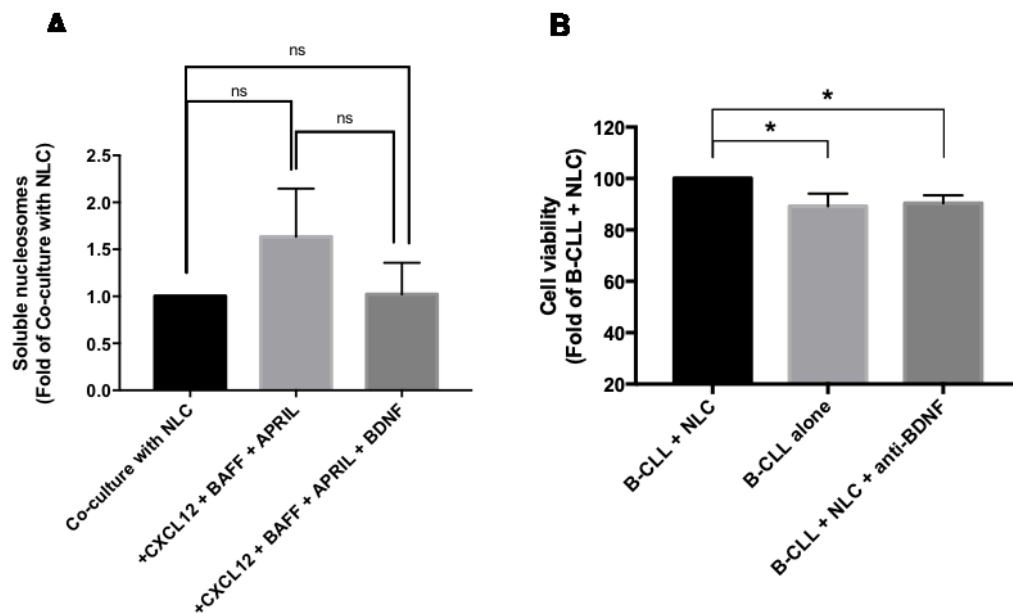
***BDNF, along with CXCL12, BAFF and APRIL, protects B-CLL from apoptosis as efficiently as Nurse-like cells***

Previous studies showed that NLCs mediate B-CLL cells apoptosis resistance through the secretion of soluble CXCL12<sup>10</sup>, BAFF and APRIL<sup>15</sup>, but that the three of them only partially accounted for the NLCs-mediated protection. Since we observed that NLCs produce BDNF and that they upregulate BDNF expression in B-CLL, and that we previously

demonstrated that BDNF protects circulating B-CLL cells from apoptosis<sup>4</sup>, we hypothesize that BDNF might be the missing factor in this B-CLL induced survival equation.

We evaluated B-CLL apoptosis, by detection of cytoplasmic soluble nucleosomes, of cells cultured either with NLCs, with exogenous CXCL12, BAFF and APRIL (using previously described conditions<sup>10,15</sup>) or in the same condition with the addition of BDNF (Figure 5A). Our results confirm that the combination of CXCL12, BAFF and APRIL is not sufficient to protect B-CLL cells from apoptosis as efficiently as NLCs. The addition of BDNF restores a protection similar against apoptosis than the one mediated by NLCs (Figure 5A).

To further confirm the implication of BDNF in NLCs-mediated apoptosis protection, viability of B-CLL cultured with NLCs, alone, or with NLCs and a BDNF neutralizing antibody was determined by Annexin V-PI staining. Viability of B-CLL decreased when cultured alone compared to those co-cultured with NLCs (Figure 5B). A similar decrease in viability was obtained by neutralization of BDNF in co-culture conditions (Figure 5B). This result suggests that NLCs-mediated protection of B-CLL against apoptosis is BDNF-dependent.



**Figure 5 : NLCs protect B-CLL from death through BDNF.** (A) ELISA Cell Death Detection was performed on B-CLL cells from 4 patients co-cultured with NLC, or cultured alone with CXCL12/BAFF/APRIL, or with CXCL12/BAFF/APRIL and BDNF (100 ng/mL) for 8 days (Co-culture with NLCs vs CXCL12/BAFF/APRIL,  $p=0,2367$ ; Co-culture with NLCs vs CXCL12/BAFF/APRIL/BDNF,  $p=0,9671$ ; CXCL12/BAFF/APRIL vs CXCL12/BAFF/APRIL/BDNF,  $p=0,2515$ ) (B) Cell viability was assessed by exclusion of

Annexin V and Propidium Iodide positive cells by flow cytometry. B-CLL cells were cultured for 48h either alone, with NLCs, or with NLCs and a BDNF blocking antibody.

## Discussion

B-CLL lymphocytes are characterized by an aberrant resistance to apoptosis leading to their accumulation in peripheral blood and lymphoid organs<sup>1,2</sup>. Apoptosis resistance is mediated by sustained activation of pro-survival signaling pathways<sup>23,24</sup> and high expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins<sup>25</sup>. Various mechanisms associated with B-CLL cell survival, many of which are related to B-cell receptor (BCR) activation. Encouraging treatment results have been observed using kinase inhibitors targeting the BCR pathway<sup>26</sup> but cases of resistance to this treatment and relapse in CLL patients are frequent<sup>27-30</sup>, highlighting current treatments deficiencies and suggesting the involvement of other mechanisms in CLL pathogenesis.

In secondary lymphoid organs, the TME of CLL plays an important role in this physio-pathology. Cellular components in the TME, among them NLCs, promote B-CLL cell recruitment, survival and proliferation<sup>31</sup>. NLCs promote B-CLL survival through secretion of soluble factors<sup>10,15</sup> and cell to cell contact<sup>17</sup>. They produce high quantities of CXCL12<sup>32</sup>, implicated in both B-CLL cells chemotaxis<sup>14,32,33</sup>, and survival through ERK and Akt signaling pathways activation<sup>10,34</sup>. BAFF and APRIL are also secreted by NLCs<sup>35</sup> and promote survival through the activation of NF- $\kappa$ B signaling and Bcl-2 family member protein Mcl-1<sup>15</sup>. However BAFF, APRIL and CXCL12 only partly rescue B-CLL cells from apoptosis compared to co-culture with NLCs<sup>10,15</sup>.

B-CLL cells have a different gene expression profile depending on their TME, notably concerning BCR pathway genes<sup>36</sup>. A previous study identified the top 10 of upregulated genes in B-CLL after a co-culture with NLCs, among them *CCL3* (Chemokine (C-C motif) ligand 3), *CCL4*, *MYCN* and *TNFRSF17* (coding for B Cell Maturation Antigen, BCMA, receptor of BAFF)<sup>16</sup>. From the same dataset we analyzed the expression variations of genes involved in a newly identified pro-survival pathway. We previously reported a newly identified pro-survival signaling pathway in circulating B-CLL cells implicating a complex formed by NTSR2 and TrkB<sup>4</sup>. Similarly to other GPCR-TKR signaling platform studies<sup>37,38</sup>, NTSR2 is transactivated by TrkB upon binding of BDNF. This complex engages survival signaling pathways through Src, MAPK and PI3K/Akt, leading to expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins.

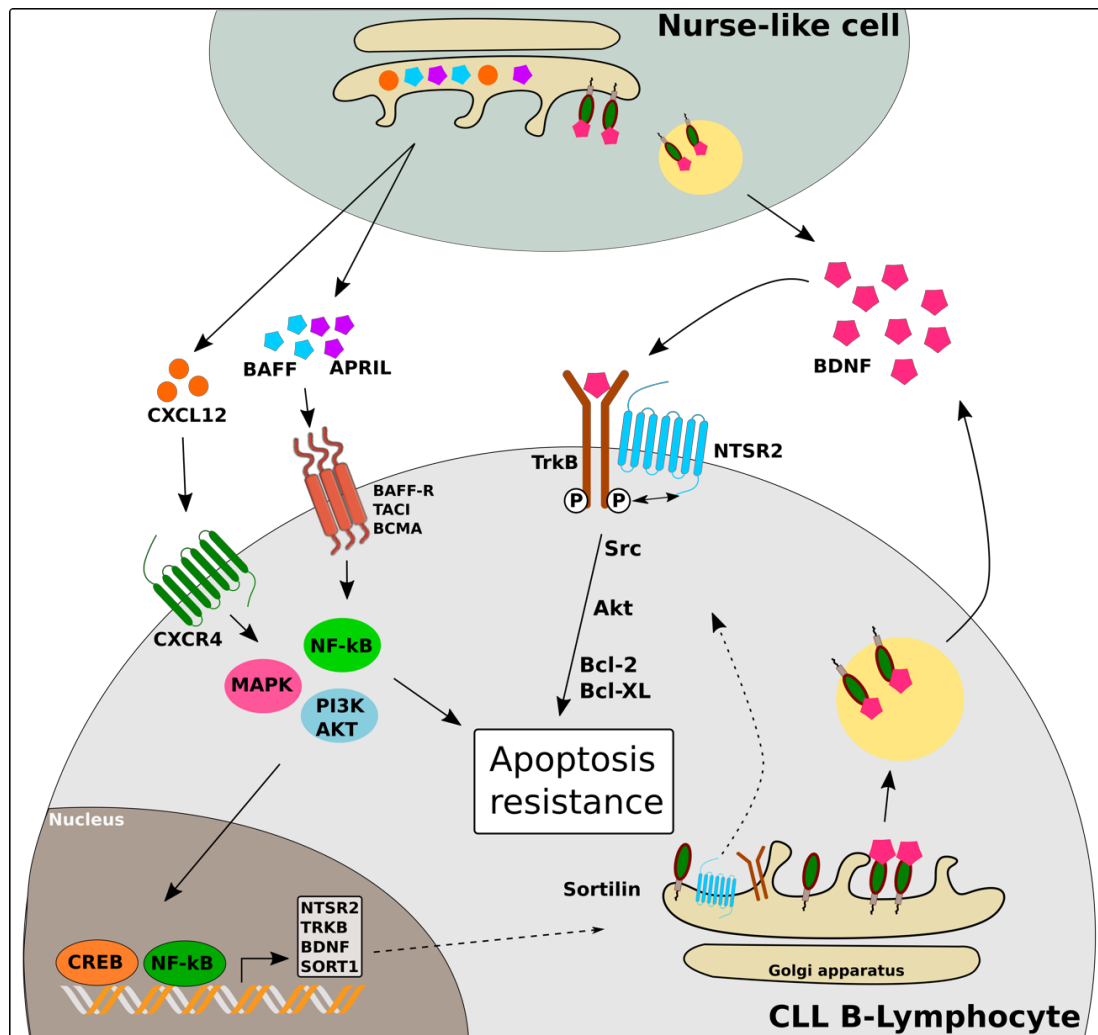
Our analysis revealed that *NTRK2*, encoding TrkB, *SORT1* and *BDNF* were upregulated in B-CLL co-cultured with NLCs (Figure 3A), which led us to believe that NLCs might promote the activation of this survival pathway. Moreover, our experiments showed a higher expression of BDNF in lymph nodes of CLL patients, correlating with previous observation showed a highly expressed BDNF in circulating B-CLL lymphocytes and its concentration is higher in CLL patients plasma than in healthy controls<sup>4</sup>. Co-culture with NLCs enhanced protein expression of both BDNF and NTSR2 as well as Src pro-survival signaling in B-CLL cells (Figure 3B-C). Moreover, sortilin expression was also increased in co-culture conditions. This protein is known to regulate neurotrophins and pro-neurotrophins transport from the Golgi apparatus to the plasma membrane for secretion<sup>22</sup> and has been identified as a key player in a BDNF autocrine survival loop in B lymphocytes<sup>21</sup>. Sortilin is also involved in the anterograde transport of Trk receptors, increasing neurotrophin signaling<sup>39</sup>. These data suggest that in presence of NLCs, the pro-survival autocrine loop implicating NTSR2-TrkB-BDNF and the intracellular trafficking regulator sortilin is enhanced.

In Mec-1 cell line, NTSR2, BDNF and sortilin protein expression were enhanced by addition of CXCL12, BAFF and APRIL in the culture medium, arguing an upregulation in response to the signaling pathways thus activated. CXCL12 engages, *via* binding to its receptor CXCR4, both MAPK and PI3K/Akt signaling pathways<sup>40</sup>, resulting in activation of transcription factors CREB (cAMP responsive element binding protein)<sup>41</sup> and NF- $\kappa$ B<sup>42</sup>. BAFF and APRIL, through their interaction with their receptors BAFF-R, TACI (transmembrane activator and CAML interactor) and BCMA, activate signaling *via* PI3K/Akt and NK- $\kappa$ B pathways<sup>43</sup>, and PI3K/Akt can also induce activation of CREB<sup>44</sup>. Here we report that *NTSR2*, *SORT1*, and *BDNF* might be potential new targets for the transcription factor NF- $\kappa$ B and CREB in B-CLL. Indeed, a putative CREB binding site was identified in the promoter region of mouse *NTSR2*<sup>45</sup>. In the mouse, rat and human promoter region of *BDNF*, a NF- $\kappa$ B binding site was identified, moreover NF- $\kappa$ B regulates BDNF transcription<sup>46-48</sup>. A CRE (Ca<sup>2+</sup> response element) is also present within *BDNF* promoter, and binding of CREB regulates BDNF transcription<sup>49,48</sup>. Moreover, *NTRK2* transcription is CREB-dependent as well<sup>50</sup>. Very little is known about *SORT1* transcription regulation, other than the fact that there is a C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins) binding site on its promoter<sup>51</sup>. Taken together, these data seem to indicate that signaling induced by CXCL12, BAFF and APRIL might lead to activation of CREB and NF- $\kappa$ B, and upregulation of NTSR2, BDNF, TrkB and sortilin.



BDNF and sortilin expression was also detected in NLC (Figure 2C-D), with an increase in sortilin expression compared to normal monocytes (Figure 2E), suggesting an ability of NLCs to secrete BDNF, further promoting NTSR2-TrkB signaling in B-CLL cells in a paracrine way.

CXCL12, BAFF and APRIL together only partly protect B-CLL cells from apoptosis compared to co-culture with NLCs. The addition of BDNF to the combination seems to rescue the protective level observed in co-cultures with NLCs. Furthermore, BDNF neutralization suggests that NLCs-mediated protection of B-CLL against apoptosis is BDNF-dependent. Taken together, our results highlight that NLCs mediate apoptosis resistance through a combination of soluble factors CXCL12, BAFF, APRIL and BDNF. Soluble CXCL12, BAFF and APRIL have a protective effect of their own, but additionally potentiate BDNF autocrine/paracrine pro-survival signaling through the NTSR2-TrkB complex (Figure 6).



**Figure 6 : Proposed model of B-CLL cell pro-survival NTSR2-TrkB-BDNF pathway promotion by NLC.** In B-CLL, the NTSR2-TrkB complex is activated by BDNF and promotes apoptosis resistance through the Src/Akt signaling pathway. BDNF is overexpressed in the CLL TME and is produced by both B-CLL and NLCs. The NTSR2-TrkB-BDNF signaling pathway is further promoted by NLCs. Indeed, NLCs secrete CXCL12, BAFF and APRIL, which have a protective effect of their own, but also stimulate expression of NTSR2, TrkB, BDNF and trafficking regulator sortilin. Upon activation of their receptors CXCR4, BAFF-R, BCMA and TACI, signaling pathways MAPK, PI3K/Akt and transcription factors CREB and NF- $\kappa$ B are activated. These transcription factors are probably implicated in the observed upregulation of NTSR2, TrkB, BDNF and sortilin. Thus, NLCs protect B-CLL against apoptosis by promoting the NTSR2-TrkB-BDNF signaling pathway.

For the last two decades, the CLL microenvironment has emerged as a key regulator of B-CLL cells survival and proliferation<sup>7,52</sup>. Here we show that *in vitro*, NLCs promote the apoptosis resistance pathway NTSR2-TrkB-BDNF, and argue that they might also promote this pathway in the lymph nodes proliferation centers where they are located *in vivo*. Considering that NTSR2-TrkB-BDNF is overexpressed and plays an important role in apoptosis resistance

in circulating B-CLL lymphocytes, and is further upregulated by microenvironment NLCs, we argue that inhibition of this pathway, alongside current treatments such as ibrutinib<sup>®</sup>, idelalisib<sup>®</sup> and venetoclax<sup>®</sup>, might constitute a new strategy to eradicate apoptosis resistant lymphocytes more thoroughly in CLL cases.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Author Contributions**

HT performed the experiments and wrote the original draft of the manuscript, SS provided precious help in experiment design and data analysis, SS, TN, ALF and MOJ reviewed and edited the manuscript and supervised this work.

### **Acknowledgements**

The authors thank Sabrina Blondy, Hafidha Bentayeb and Aurélie Perraud for their technical advice and valuable suggestions. We are grateful to Alain Chauvanel and the Tumor Bank of Limoges University Hospital for providing lymph nodes samples, and to the Biological Hématology department of Limoges University Hospital for collecting CLL blood samples.

This work was supported and funded by grants from, FEDER (Fonds européen de développement régional), the Limousin regional council, La Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie) from Limoges.

### **References**

1. Caligaris-Cappio, F. *et al.* The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* **19**, 601–613 (1993).
2. Kitada, S., Pedersen, I. M., Schimmer, A. D. & Reed, J. C. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* **21**, 3459–3474 (2002).
3. Rossi, D. *et al.* Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 1403–1412 (2013).
4. Abbaci, A. *et al.* Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis. *Oncogene* (2017). doi:10.1038/onc.2017.365

5. Barragán, M. *et al.* Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **99**, 2969–2976 (2002).
6. Cuní, S. *et al.* A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* **18**, 1391–1400 (2004).
7. Burger, J. A. The CLL Cell Microenvironment. in *Advances in Chronic Lymphocytic Leukemia* (ed. Malek, S.) 25–45 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-8051-8\_2
8. Patten, P. E. M. *et al.* CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* **111**, 5173–5181 (2008).
9. Giannoni, P. *et al.* An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica* **96**, 1015–1023 (2011).
10. Burger, J. A. *et al.* Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655–2663 (2000).
11. Boissard, F., Fournié, J.-J., Laurent, C., Poupot, M. & Ysebaert, L. Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 1570–1572 (2015).
12. Jia, L. *et al.* Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 1709–1719 (2014).
13. Polk, A. *et al.* Colony-Stimulating Factor-1 Receptor Is Required for Nurse-like Cell Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **22**, 6118–6128 (2016).
14. Burger, M. *et al.* Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **106**, 1824–1830 (2005).
15. Nishio, M. *et al.* Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* **106**, 1012–1020 (2005).
16. Burger, J. A. *et al.* High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* **113**, 3050–3058 (2009).
17. Boissard, F. *et al.* Nurse-like cells promote CLL survival through LFA-3/CD2 interactions. *Oncotarget* **8**, 52225–52236 (2016).
18. Saada, S. *et al.* Differential Expression of Neurotensin and Specific Receptors, NTSR1 and NTSR2, in Normal and Malignant Human B Lymphocytes. *The Journal of Immunology* **189**, 5293–5303 (2012).
19. Dubanet, L. *et al.* Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br. J. Cancer* **113**, 934–944 (2015).
20. Tosolini, M. *et al.* Human Monocyte Recognition of Adenosine-Based Cyclic Dinucleotides Unveils the A2a G $\alpha$ s Protein-Coupled Receptor Tonic Inhibition of Mitochondrially Induced Cell Death. *Mol Cell Biol* **35**, 479–495 (2015).
21. Fauchais, A.-L. *et al.* Role of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor and Sortilin in B Cell Survival. *The Journal of Immunology* **181**, 3027–3038 (2008).
22. Nykjaer, A. & Willnow, T. E. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* **35**, 261–270 (2012).
23. Longo, P. G. *et al.* The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **111**, 846–855 (2008).

24. Longo, P. G. *et al.* The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* **21**, 110–120 (2007).
25. Kitada, S. *et al.* Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**, 3379–3389 (1998).
26. Woyach, J. A., Johnson, A. J. & Byrd, J. C. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* **120**, 1175–1184 (2012).
27. Woyach, J. A. *et al.* Resistance Mechanisms for the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *New England Journal of Medicine* **370**, 2286–2294 (2014).
28. Woyach, J. A. *et al.* BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1437–1443 (2017).
29. Arruga, F. & Deaglio, S. Mechanisms of Resistance to Targeted Therapies in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Handb Exp Pharmacol* (2017). doi:10.1007/164\_2017\_12
30. Ahn, I. E. *et al.* Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **129**, 1469–1479 (2017).
31. Choi, M. Y., Kashyap, M. K. & Kumar, D. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract Res Clin Haematol* **29**, 40–53 (2016).
32. Burger, J. A., Burger, M. & Kipps, T. J. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* **94**, 3658–3667 (1999).
33. Messmer, B. T. *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* **115**, 755–764 (2005).
34. Nishio, M. *et al.* Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* **106**, 1012–1020 (2005).
35. Croci, D. O. *et al.* Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia* **27**, 1413–1416 (2013).
36. Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574 (2011).
37. Cattaneo, F. *et al.* Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* **15**, 19700–19728 (2014).
38. Delcourt, N., Bockaert, J. & Marin, P. GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 602–607 (2007).
39. Vaegter, C. B. *et al.* Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* **14**, 54–61 (2011).
40. Teicher, B. A. & Fricker, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 2927–2931 (2010).
41. Joo, E.-K. *et al.* Enhancement of Cell Survival by Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCL12 Involves Activation of CREB and Induction of Mcl-1 and c-Fos in Factor-Dependent Human Cell Line MO7e. *Stem Cells and Development* **13**, 563–570 (2004).
42. Cojoc, M. *et al.* Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets Ther* **6**, 1347–1361 (2013).
43. Zapata, G. P.-C. and J. M. Mouse Models of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Chronic Lymphocytic Leukemia* (2012). doi:10.5772/27091
44. Wang, J.-M. *et al.* The Antiapoptotic Gene mcl-1 Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex Containing CREB. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 6195–6206 (1999).

45. Sun, Y.-J., Maeno, H., Aoki, S. & Wada, K. Mouse neurotensin receptor 2 gene (Ntsr2): genomic organization, transcriptional regulation and genetic mapping on chromosome 12. *Molecular Brain Research* **95**, 167–171 (2001).
46. Marini, A. M. *et al.* Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor. Neurol. Neurosci.* **22**, 121–130 (2004).
47. Lipsky, R. H. *et al.* Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J. Neurochem.* **78**, 254–264 (2001).
48. Zheng, F., Zhou, X., Moon, C. & Wang, H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **4**, 188–200 (2012).
49. Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J. & Greenberg, M. E. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**, 709–726 (1998).
50. Kingsbury, T. J. & Krueger, B. K. Ca<sup>2+</sup>, CREB and krüppel: a novel KLF7-binding element conserved in mouse and human TRKB promoters is required for CREB-dependent transcription. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 447–455 (2007).
51. Musunuru, K. *et al.* From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* **466**, 714–719 (2010).
52. Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17008 (2017).

## V.5. Résultats complémentaires et perspectives à court terme

Ayant observé dans l'article précédent que la sortiline est uprégulée dans les LB-LLC lors des co-cultures avec les NLCs et qu'elle est également fortement exprimée par les NLCs, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être impliquée dans des mécanismes pro-survie au-delà de ses interactions avec NTSR2-TrkB-BDNF. Connaissant l'importance du rôle de la sortiline dans les régulations du transport intracellulaire des protéines, nous avons étudié son interactome dans LB-LLC et les NLCs.

Après analyse prospective sur la base de données « *String-database* » des interactions possibles de la sortiline (Figure 31), nous avons identifié des liens potentiels entre la sortiline et TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*). TRAF6 est une protéine adaptatrice, connue pour interagir avec p75<sup>NTR</sup> (Figure 32A) et permet de recruter les protéines de signalisation suite à son activation (Khursigara et al., 1999). Son rôle est particulièrement intéressant étant donné qu'elle est également impliquée dans les mécanismes de signalisation par les récepteurs de BAFF et APRIL (Figure 32B) (Secreto et al., 2014). La sortiline étant connue pour son rôle de co-récepteur de p75<sup>NTR</sup>/TRAF6 et de régulateur du transport intracellulaire, nous avons voulu étudier ses interactions avec BAFF et APRIL et leurs récepteurs, ainsi qu'avec TRAF6.

Un second axe, apparu sur l'analyse par la « *String-database* », est l'interaction entre des membres de la famille des neurotrophines et le couple CXCR4/CXCL12. L'interaction physique entre ces protéines n'a fait l'objet d'aucun article à notre connaissance. Cependant, il a été précédemment démontré que les neurotrophines régulent l'expression des récepteurs aux chimiokines dans le cerveau (Avdoshina et al., 2011). Dans les neurones, il a été montré que le BDNF et NGF induisaient une diminution de l'expression de CXCR4 et CCR5, de plus, le BDNF induit une internalisation rapide de CXCR4 (Ahmed et al., 2008; Avalos et al., 2014; Nosheny et al., 2007). Ces données nous ont conduits à nous demander s'il y avait un lien entre les neurotrophines et les mécanismes de *homing* dépendant de CXCL12/CXCR4 dans la LLC, et l'éventuel rôle de la sortiline dans ce mécanisme.

L'ensemble des résultats présentés ici ne sont que préliminaires et nécessitent confirmation et approfondissement, mais permettent tout de même d'ouvrir des perspectives pour la suite de notre étude sur l'implication des systèmes neurotrophiques et neurotensinergiques dans la pathogénèse de la LLC.

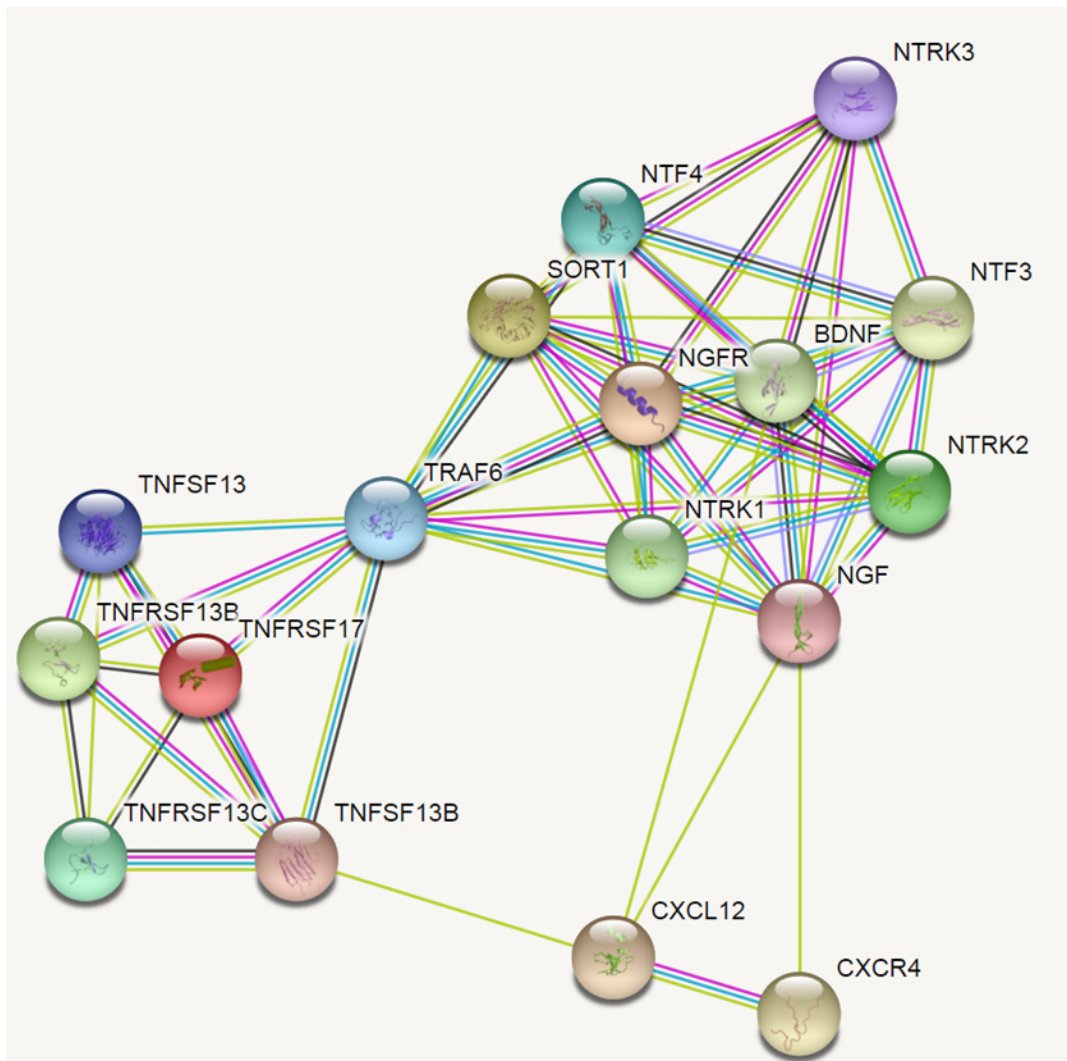


Figure 31 : Analyse des interactions potentielles de la sortiline (SORT1) selon la base de données "String-database".

*TNFSF13* : gène codant pour APRIL, *TNFSF13B* : gène codant pour BAFF, *TNFRSF13B* : gène codant pour TACI, *TNFRSF13C* : gène codant pour BAFF-R, *TNFRSF17* : gène codant pour BCMA. *NTRK1/2/3* : gènes codants respectivement pour TrkA, TrkB et TrkC, *NGFR* : gène codant pour p75<sup>NTR</sup>, *NTF3* et *NTF4* : gènes codant NT-3 et NT-4/5, *SORT1* : gène codant pour la sortiline. *TRAF6*, *CXCL12*, *CXCR4*, *NGF* et *BDNF* codent les protéines du même nom.



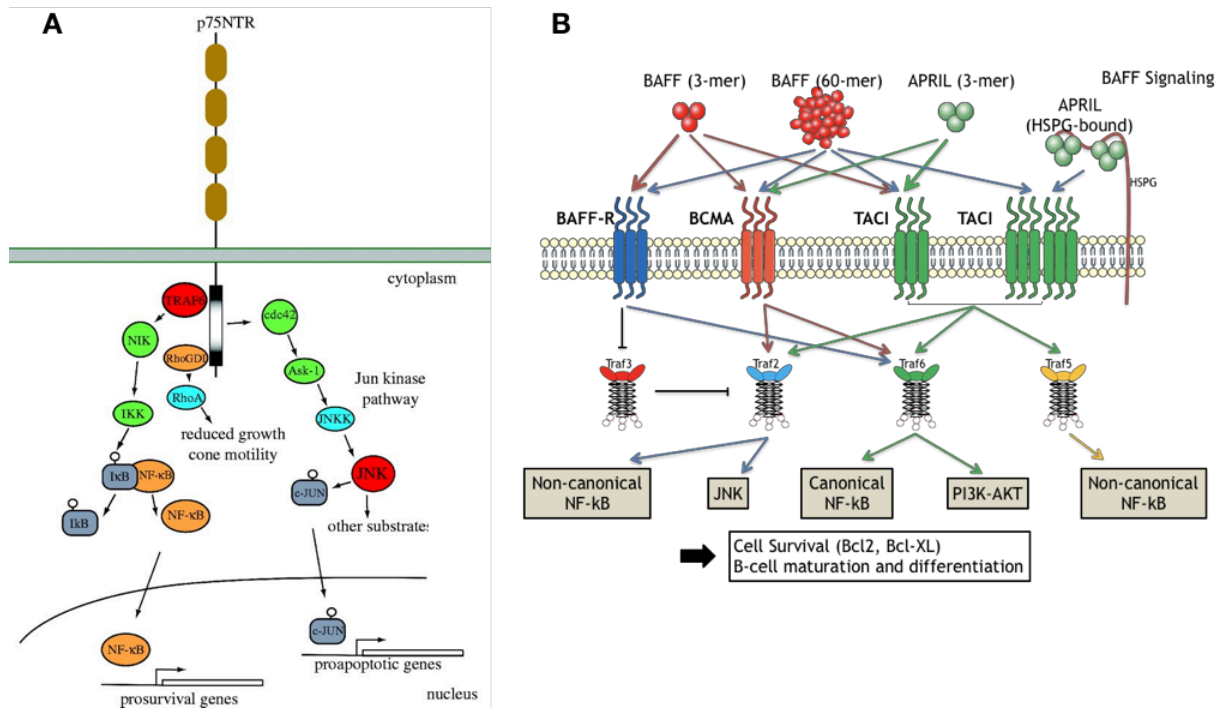


Figure 32 : Mécanismes de signalisation impliquant TRAF6.

(A) TRAF6 et signalisation par p75<sup>NTR</sup> (extrait de (Reichardt, 2006)). Le recrutement deTraf6 par p75<sup>NTR</sup> induit l'activation de la voie NF-κB (B) TRAF6 et signalisation par BAFF, APRIL et leurs récepteurs BAFF-R, TACI et BCMA. Les trimères (3-mer) et hexadécamères (60-mer) de BAFF peuvent se lier à BAFF-R, BCMA et TACI, tandis que les trimères d'APRIL, solubles ou liés aux HSPGs (*heparan sulfate proteoglycans*) peuvent seulement se lier sur BCMA et TACI. L'activation des récepteurs par BAFF et APRIL entraîne le recrutement des protéines adaptatrices Traf et, selon les cas, les signalisations canoniques et non-canoniques NF-κB, PI3K/Akt et JNK. Le recrutement deTraf6 par BAFF-R, BCMA ou TACI induit l'activation de la voie canonique NF-κB et de la voie PI3K/Akt.

## Matériel et méthode

Les protocoles d'immunoprécipitation, de western blot et d'immunofluorescence sont les mêmes que ceux décrits dans les articles ci-dessus. Les anticorps utilisés sont les suivants :

Anticorps	Fournisseur/clone	Application
Anti-Sortiline	Abcam, ab16640	Immunofluorescence (IF)
	Santa Cruz, E9, sc-376576	Immunoprécipitation (IP)
	BD Biosciences, clone 48	Western Blot (WB)
Anti-Traf6	Biorbyt, orb48945	IF, WB
Anti-BAFF-R	R&D, 1162	IF, WB
Anti-BDNF	R&D, MAB648	WB, IF
Anti-NGF	Santa Cruz, clone H-20	IF
Anti-NT-3	Abcam, ab124410	IF

Anti-N-4/5	Abcam, ab87394	IF
Anti-NTS	Santa Cruz, clone FL-170	IF
Anti-NTSR2	Alomone labs, ANT-016	IF
Anti-TrkB	R&D, MAB3971	IF
Anti-CXCR4	Biorbyt, orb10305	IP, WB
Anti-BAFF	Biorbyt, orb76960	Immunofluorescence
Anti-APRIL	R&D, AF884	Immunofluorescence
Anti-TACI	R&D, AF174	Immunofluorescence
Isotypique Souris	Sigma-Aldrich	IF, IP
Isotypique Lapin	Sigma-Aldrich	IF, IP

## Résultats

Nous avons premièrement étudié les interactions de la sortiline dans les lymphocytes B leucémiques ou dans les lignées de LB BL41 (lymphome de Burkitt) et Mec-1 (LLC). Une immunoprécipitation de la sortiline réalisée à partir des lignées nous a permis de confirmer la liaison entre la sortiline et le BDNF, mais également d'en identifier deux nouvelles avec TRAF6 et BAFF-R (Figure 33A). Cette interaction a été confirmée dans les LB leucémiques de patients (Figure 33B). Enfin une immunoprécipitation de CXCR4 nous a permis de mettre en évidence son interaction avec la sortiline dans les lignées BL41 et Mec-1 (Figure 33C).

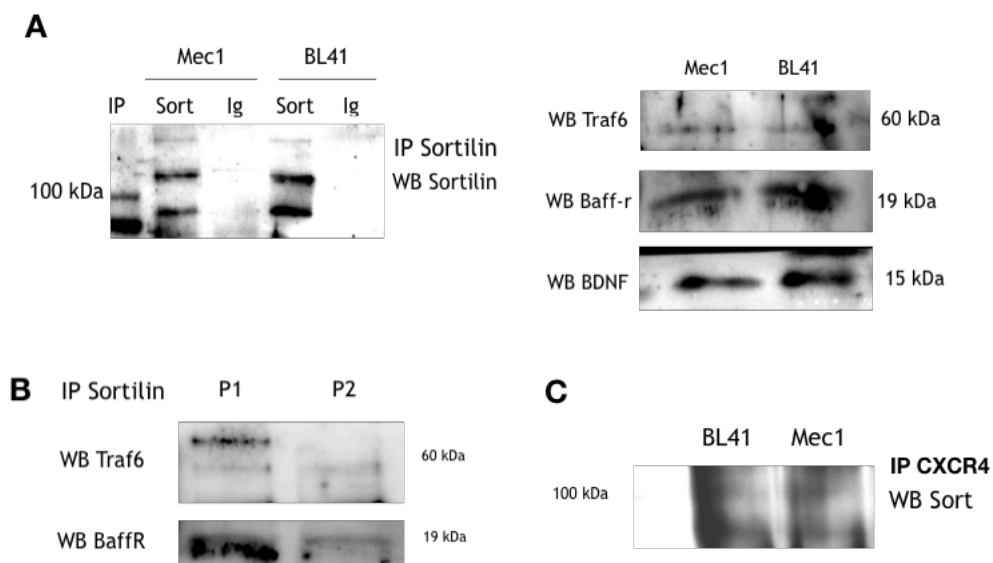


Figure 33 : Interactions de la sortiline avec BAFF-R, TRAF6 et CXCR4

(A) Immunoprécipitation de la sortiline à partir des lignées BL41 et MEC-1 suivie des western blot de la sortiline (panel de gauche), de TRAF6, BAFF-R, et BDNF, les puits Ig correspondent aux contrôles

de l'immunoprécipitation par un anticorps isotypique **(B)** Immunoprécipitation de la sortiline à partir des LB-LLC de patients, suivie des western blot de TRAF6 et BAFF-R **(C)** Immunoprécipitation de CXCR4 à partir des lignées BL41 et MEC-1 suivie du western blot de la sortiline

Par la suite, nous avons évalué la co-localisation de la sortiline avec BAFF-R, TACI et TRAF6 dans les LB-LLC. Ces protéines sont bien co-exprimées dans les LB-LLC et semblent être légèrement co-localisées, mais avec des coefficients de Manders faibles (Figure 34A). La co-localisation semble être la plus forte pour le récepteur TACI. Enfin nous avons étudié l'interaction de la sortiline avec BAFF et APRIL dans les NLCs, connues pour leur forte production de ces ligands. L'interaction avec APRIL semble faible, mais celle avec BAFF est plus prononcée (Figure 34B), indiquant un rôle potentiel de la sortiline dans la régulation de son trafficking et donc de sa sécrétion. Ces marquages n'ont cependant été réalisés qu'à partir de cellules issues de deux patients et nécessitent donc une plus large population ainsi qu'une confirmation du rôle de sécrétion par évaluation des quantités de BAFF et APRIL sécrétés lorsque la sortiline est inactivée.

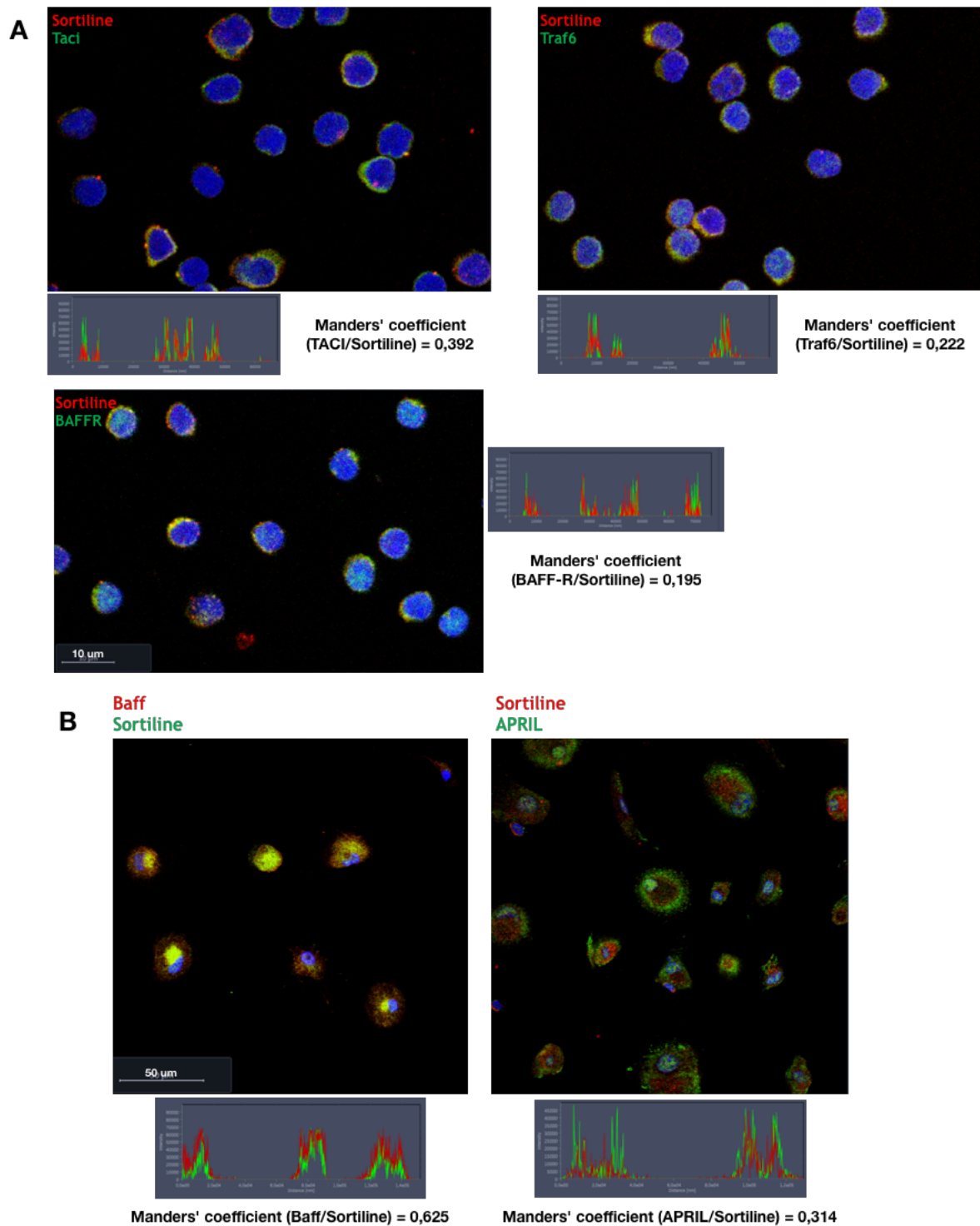


Figure 34 : Co-localisation de la sortiline avec TACI, TRAF6 et BAFF-R dans les LB-CLL et avec BAFF et APRIL dans les NLC

(A) Immunofluorescence, profils de fluorescence et coefficient de Manders associés, de la sortiline (en rouge) et TACI, TRAF6 ou BAFF-R (en vert). Marquage réalisé sur des LB-CLL. (B) Immunofluorescence, profils de fluorescence et coefficients de Manders associés, de la sortiline (en vert sur le panel de gauche et en rouge sur celui de droite) et BAFF (en rouge, panel de gauche) ou APRIL (panel de droite). Marquage réalisé sur des NLC issues de cultures de 14 jours de PBMC de patients LLC.

L'ensemble de ces résultats préliminaires indique que la sortiline pourrait jouer un rôle central au cours de la LLC. Nous avons montré dans l'article précédent que la sortiline permettrait de

réguler la signalisation neurotrophique par son interaction avec le BDNF. A ce rôle pourraient s'ajouter une régulation de la signalisation par BAFF et APRIL et ceci à deux niveaux. L'interaction avec BAFF et APRIL dans les NLCs suggère une implication potentielle de la sortiline dans leurs mécanismes de sécrétion. De plus la sortiline paraît être également liée à leurs récepteurs, TACI et BAFF-R, probablement par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRAF6. Connaissant les rôles multiples de la sortiline, nous ne pouvons pour le moment que spéculer sur l'effet de ces interactions. Comme pour son rôle de co-récepteur de p75<sup>NTR</sup>, elle pourrait influencer la signalisation induite par ces récepteurs, ou elle pourrait également réguler leur adressage vers la membrane, comme elle le fait pour les récepteurs Trks.

Une interaction impliquant CXCR4 et la sortiline semble apparaître, suggérant un rôle potentiel dans les mécanismes de survie induits par CXCL12, mais surtout un rôle dans les mécanismes de chimiotactisme par le couple CXCR4/CXCL12, importants pour le *homing* des LB-LLC, qui pourraient être régulés par la sortiline et plus largement par les neurotrophines. Plusieurs études ont déjà été réalisées à ce sujet, et les résultats semblent varier selon les modèles. Dans les macrophages dérivés de monocytes, les neurotrophines, notamment le NGF, induisent une augmentation de CXCR4 et une amélioration de la migration vers CXCL12 (Samah et al., 2008). Le couple CXCL12/CXCR4 stimule l'expression des neurotrophines dans les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse pour promouvoir leur migration vers les sites de réparation suite à un dommage de la moelle épinière (Wang et al., 2017). Dans l'hippocampe de rats, les expressions de BDNF, CXCL12 et CXCR4 sont augmentées chez les rats élevés en environnement enrichi, favorisant la survie, la prolifération et la différenciation des neurones nouvellement formés dans le gyrus denté (Zhang et al., 2016). Dans des cellules souches neuronales intra-artérielles, le traitement par le BDNF induit une augmentation de l'expression de CXCR4 et améliore la migration vers CXCL12 (Rosenblum et al., 2015). Cependant d'autres études au niveau neuronal ont montré l'effet inverse, le BDNF y induit une internalisation de CXCR4 et donc une diminution de son expression, associée à une migration diminuée (Ahmed et al., 2008; Nosheny et al., 2007). Cette même observation a été faite récemment dans la LLC. Une étude a montré que le BDNF induisait une diminution de CXCR4 et de la migration des LB-LLC *in vitro*, cependant l'expression de CXCR4 *in vivo* ne montre pas de variation entre les patients avec une forte expression de BDNF comparés à ceux ayant une faible expression de BDNF (Azoulay et al., 2018).

La découverte de l'implication des neurotrophines et de la sortiline dans les mécanisme de survie induits par CXCL12, BAFF et APRIL, et de migration induits par CXCR4/CXCL12, dans les cas de LLC, n'en est cependant qu'à ses prémices et nécessite d'être approfondie.

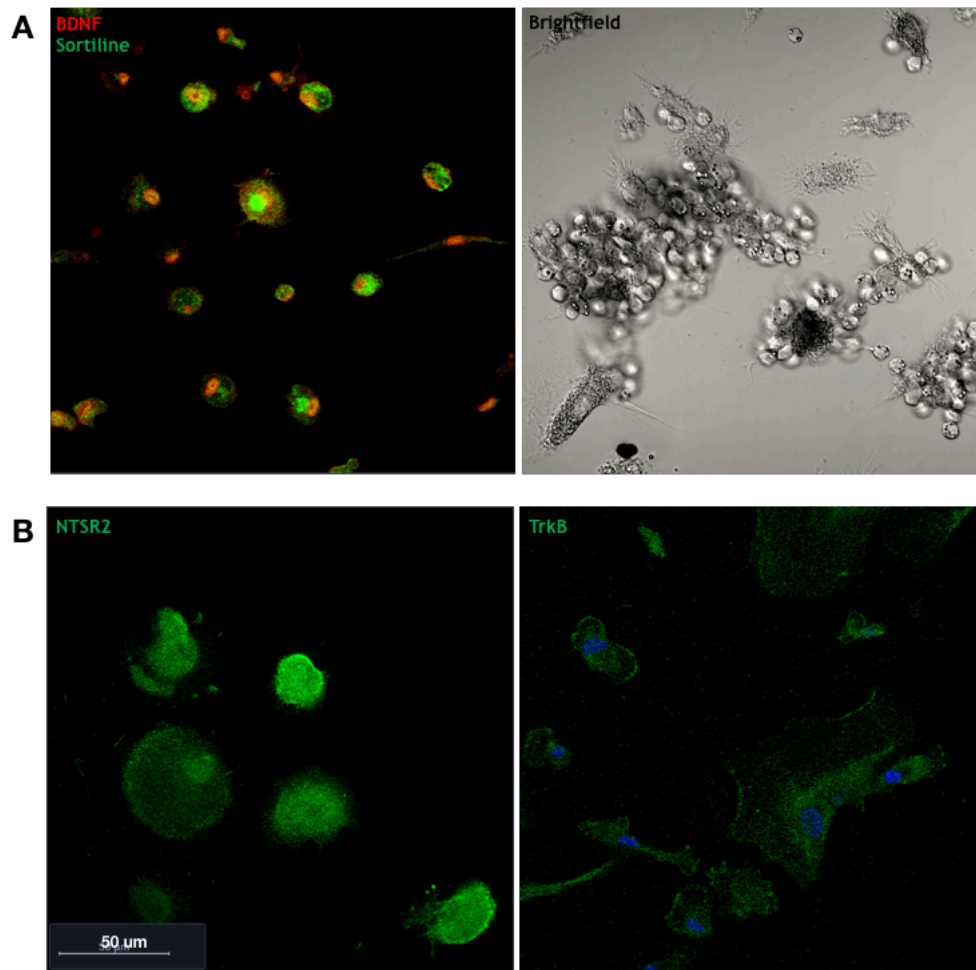


Figure 35 : Expression de la sortiline, du BDNF et des récepteurs NTSR2 et TrkB par les NLCs. **(A)** Marquage par immunofluorescence de la sortiline et du BDNF dans les NLCs. Le panel en bas à droite montre l'interaction physique entre les NLCs et les LB-LLB en co-cultures. **(B)** Marquage par immunofluorescence de NTSR2 et TrkB dans les NLCs

Dans l'article 2 présenté précédemment, nos travaux se sont concentrés sur le rôle du BDNF, exprimé par les NLCs (Figure 35A), dans les mécanismes de survie des LB-LLC. De plus, Les NLCs expriment les récepteurs TrkB et NTSR2, localisés en intracellulaire mais aussi au niveau des membranes plasmiques (Figure 35B), et pourraient ainsi être stimulées de façon autocrine/paracrine par le BDNF. Les voies de signalisation ainsi activées pourraient être impliquées dans la survie des NLCs, mais il serait également intéressant d'étudier leur implication dans les mécanismes de différenciation des NLCs indispensables à la mise en place du microenvironnement tumoral de la LLC. Enfin, un contact étroit entre les LB-LLC et

les NLCs a été observé (Figure 35A) et la relation entre cette interaction cellulaire et la promotion de NTSR2-TrkB-BDNF sera explorée. L'inhibition de la signalisation impliquant NTSR2-TrkB-BDNF pourrait entraîner une perte de ce contact cellulaire. Inversement, la culture des NLCs et des LB-LLC séparément, dans des inserts de culture cellulaire de type Transwell, pourrait mettre en évidence une nécessité du contact physique entre les cellules pour promouvoir NTSR2-TrkB-BDNF.

### **Perspectives à court terme**

Concernant le second article, des résultats nécessitent confirmation avant d'envisager la soumission. Nous avons pour le moment confirmé l'effet des NLCs sur l'expression de NTSR2-TrkB-BDNF et de la sortiline, ainsi que sur l'activation de la signalisation par Src. Nous avons également avancé que cette surexpression était due à la stimulation des LB-LLC par CXCL12, BAFF et APRIL. Cet effet n'a toutefois été observé que lors de stimulations par ces facteurs solubles, et pour confirmer leur réelle implication, des co-cultures NLCs/LB-LLC seront réalisées en présence d'anticorps bloquants pour chacun d'entre eux. La plupart des résultats ont été obtenus *ex vivo* à partir de prélèvements sanguins de patients, et présentant parfois de grands écarts d'un patient à l'autre, problème fréquemment rencontré lors de l'utilisation de cultures primaires. Afin de contrecarrer ce problème, nous proposons deux solutions. Dans un premier temps, il faudrait élargir la cohorte de patients pour apporter une meilleure significativité aux résultats. La seconde option est de confirmer tous ces résultats obtenus *ex vivo*, par des analyses *in vitro* à partir de lignées cellulaires.

Dans cette optique, nous avons fait l'acquisition d'une lignée monocyttaire, THP-1. L'avantage de cette lignée est qu'il est possible d'induire la différenciation de ces monocytes en macrophages. En effet l'addition de phorbol-12-myristate-13-124 acetate (PMA) au milieu de culture permet la différenciation en macrophages de type M0, puis l'ajout d'IFN- $\gamma$  induit leur polarisation en macrophages de type 1, tandis que l'ajout d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-10 entraîne leur polarisation en macrophages de type 2 (Chanput et al., 2014). Ces macrophages M2 pourraient être utilisés pour mimer les NLCs (Mohammad et al., 2017). La co-culture de ces cellules, à la place des NLCs, avec soit des LB-LLC primaires, soit avec la lignée Mec-1 permettra de confirmer l'effet de ces macrophages de type 2 sur l'expression de NTSR2-TrkB-BDNF. Ces cellules pourraient par ailleurs permettre la construction d'un modèle de KO sortiline par shRNA, et nous permettrait donc d'identifier précisément le rôle de la

sortiline. Ayant été détectée surexprimée dans les NLCs, notre hypothèse est que la sortiline pourrait être impliquée dans les sécrétions de BDNF, BAFF et APRIL, ce qui sera évalué par dosage dans les surnageants de cultures des lignées *SORT1*<sup>-/-</sup> par rapport à la lignée non modifiée. Une autre hypothèse serait que l'augmentation de la sortiline est impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages, ce qui sera également évalué. Enfin l'utilisation de ces lignées pourrait nous permettre d'étudier l'implication éventuelle du BDNF et de la sortiline dans les mécanismes de migration des LB-LLC dépendants de CXCL12/CXCR4.



## Discussion

---

La leucémie lymphoïde chronique se caractérise par l'accumulation, dans la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires, de lymphocytes B matures avec une faible activité proliférative et résistants à l'apoptose. Cette survie aberrante est expliquée par une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, notamment Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 (Gottardi et al., 1996; Kitada et al., 1998). La régulation de l'expression de *BCL2* impliquerait une hypométhylation de son promoteur (Hanada et al., 1993), ainsi qu'une diminution de l'expression de l'expression de miR-15a et miR-16-1, inhibiteurs de l'expression de Bcl-2 au niveau post-transcriptionnel (Cimmino et al., 2005). Les mécanismes de survie et la faible prolifération observés dans les LB-LLC seraient dépendants d'une voie de signalisation impliquant Akt et Mcl-1 (Longo et al., 2007, 2008). L'activation de ces voies de survie est liée à l'activation du BCR qui entraîne une signalisation par les kinases BTK, Lyn, Syk, ZAP-70 et PI3K (Muzio et al., 2008; Stevenson et al., 2011). D'autres facteurs ont été décrits pour leur implication dans la LLC (Ghosh and Kay, 2013), notamment des facteurs de croissance et leurs récepteurs tels que Notch (Rosati et al., 2009), IGF-1R (Yaktapour et al., 2013), ou des RCPGs comme les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CXCR5 (Burger et al., 1999; Bürkle et al., 2007).

Dans les cas de LLC, le microenvironnement tumoral joue un rôle particulièrement important dans la promotion des mécanismes de survie et de prolifération des LB-LLC. Ce microenvironnement tumoral est localisé au sein des organes lymphoïdes secondaires et est constitué notamment de cellules stromales, de LT, de NK et de macrophages de type 2, les NLCs (Burger, 2011, 2013). Les cellules du microenvironnement, et notamment les NLCs, stimulent l'activation du BCR des LB-LLC, attirent les LB-LLC par chimiotactisme *via* CXCL12 et CXCL13, promeuvent l'immuno-échappement des cellules leucémiques, supportent leurs mécanismes de survie *via* par exemple CXCL12, BAFF et APRIL et sont en partie responsables des résistances thérapeutiques (Burger, 2013; Choi et al., 2016; Filip et al., 2015).

Les traitements actuels de la LLC comprennent des inhibiteurs de la voie de signalisation du BCR (ibrutinib et idelalisib), de Bcl-2 (venetoclax) et, plus récemment, des inhibiteurs ciblant le *homing* (anti-CXCR4 et anti-CXCL12) ou encore l'apparition des NLCs au sein du microenvironnement tumoral (Burger and O'Brien, 2018). Malgré leur excellente efficacité, aucun de ces traitements n'est curatif et de nombreux cas de récives et de

résistances thérapeutiques ont été rapportés (Burger and O'Brien, 2018). L'identification de nouveaux mécanismes de survie mis en jeu par les LB-LLC est ainsi d'un enjeu majeur afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

Avec cet objectif en vue, l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont portés sur l'identification du rôle d'une neurotrophine, le BDNF, son récepteur TrkB, le récepteur à la neurotensine NTSR2, surexprimé dans les LB-LLC (Saada et al., 2012) et la protéine de transport sortiline dans les mécanismes responsables de la survie aberrante des lymphocytes B leucémiques dans les cas de LLC.

L'implication de NTSR2 dans les cancers n'est cependant que très peu décrite. Il est surexprimé dans les stades avancés de cancers de la prostate (Swift et al., 2010) et est détecté dans des lignées cellulaires de cancer colorectal et du pharynx (Haase et al., 2006) mais son rôle n'y est pas décrit. Dans notre étude, la surexpression de NTSR2 a été observée pour tous les patients inclus dans l'étude, et cette surexpression ne semble rattaché à aucun facteur pronostic connu, maladie en phase indolente ou progressive, statut mutationnel *IGHV*, mutations *TP53*, expression de CD38 ou anomalie cytogénétique del13q14. Compte tenu du fait que le gène *NTSR2* se situe sur le bras court du chromosome 2, au niveau de la région concernée par le gain 2p présent dans 28% des cas de LLC en stade avancé (Cosson et al., 2017; Fabris et al., 2013; Ma et al., 2011), une collaboration avec le Dr Nathalie Gachard (Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges) a été initiée pour rechercher l'implication de ce gain 2p dans la surexpression de NTSR2. Une étude par FISH (*fluorescent in situ hybridization*) réalisée sur les LB-LLC de patients surexprimant tous NTSR2 permettra d'évaluer la fréquence du gain de *NTSR2*. Cette technique étant peu sensible, les résultats obtenus seront confirmés par CGH array (*comparative genomic hybridization array*).

La transcription des gènes *NTSR1* et *NTSR2* a été identifiée comme régulée par la méthylation de leurs promoteurs dans les cancers du côlon, du sein, ou neuroendocrines (Kim et al., 2015, 2017; Van der Auwera et al., 2010). La méthylation/déméthylation de l'ADN joue un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans la pathogénèse de la LLC (Bagacean et al., 2017a, 2017b; Chantepie et al., 2012), et une hypométhylation globale de l'ADN a été observée dans cette pathologie (Cahill and Rosenquist, 2013). L'étude de l'état de méthylation du promoteur de *NSTR2* sera ainsi prochainement réalisée, l'hypothèse étant qu'il soit hypométhylé, expliquant sa surexpression.

La première partie de nos travaux décrit pour la première fois un rôle anti-apoptotique du récepteur NTSR2 dans les LB-LLC. Le récepteur NTSR2 est surexprimé à la surface des

LB-LLC circulants, où il est constitutivement activé malgré une forte diminution de concentration de neurotensine plasmatique. Nous avons démontré, par inactivation et par surexpression de ce récepteur, qu'il entraîne une activation de la tyrosine kinase Src et est associé à une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Un effet similaire avait précédemment été décrit pour NTSR1 dans le cancer du sein, qui activait la voie des MAPKs, après liaison de la neurotensine, induisant la transcription de *BCL2* (Somaï et al., 2002). Dans le cas de la LLC, l'augmentation de l'expression de Bcl-2 n'est cependant pas due à une augmentation de sa transcription. Plusieurs hypothèses sont possibles, l'activation de NTSR2 pourrait réguler négativement l'expression des miR-15-a et miR-16-1, inhibiteurs post-transcriptionnels de Bcl-2, augmenter l'expression de nucléoline, stabilisant l'ARNm de Bcl-2 (Willimott and Wagner, 2010), ou encore impacter les modifications post-traductionnelles telle que l'ubiquitination responsable de la dégradation de Bcl-2 par le protéasome (Rooswinkel et al., 2014).

La neurotensine étant fortement diminuée dans les cas de LLC, le mécanisme responsable de l'activation constitutive de NTSR2 pose question. Des interactions fonctionnelles entre des RCPGs et des RTKs ont été décrites (Cattaneo et al., 2014b). Le récepteur NTSR1 est impliqué dans la transactivation de l'EGFR dans les cancers du sein et du poumon (Amorino et al., 2007; Dupouy et al., 2014; Younes et al., 2014) tandis que de nombreux mécanismes de transactivation impliquant les récepteurs Trks et les RCPGs, notamment les récepteurs à l'adénosine, la sérotonine et le PACAP, ont été mis en évidence (Mitre et al., 2017). L'activation constitutive de NTSR2 pourrait ainsi être liée à la transactivation de ce récepteur par un RTK.

Le récepteur TrkB et son ligand, le BDNF, sont impliqués dans le développement de nombreux cancers, dont certaines hémopathies malignes. Le BDNF active les voies PI3K/Akt et des MAPKs, contribuant à la survie, la croissance et la résistance thérapeutique de plasmocytes tumoraux issus de myélome multiple (Pearse et al., 2005). Au sein de notre équipe, le BDNF et TrkB ont été identifiés dans les mécanismes de survie et de résistance à l'apoptose dans des lignées de LB humains (Fauchais et al., 2008), ainsi que dans le DLBCL (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015).

Dans les LB-LLC, nous avons identifié une surexpression de TrkB, ainsi qu'une production de BDNF accrue et une concentration plasmatique de BDNF supérieure à celle observée pour des sujets sains. Les récepteurs TrkB et NTSR2 régulent leur expression mutuelle, ainsi nous avons montré qu'une surexpression de l'un entraîne une augmentation de

la transcription de l'autre. Une interaction physique a été mise en évidence entre les deux récepteurs au niveau de la membrane plasmique des LB-LLC, suggérant que TrkB et NTSR2 pourraient être des co-récepteurs. Cette hypothèse s'est confirmée, le complexe TrkB-NTSR2 active ainsi les voies de signalisation par p38MAPK, ERK1/2, JNK et Src suite à la stimulation par le BDNF. Le BDNF entraîne le recrutement de la protéine  $G_{i\alpha}$  par NTSR2 ainsi qu'une phosphorylation du récepteur, caractéristique de son activation. Une inhibition de la protéine  $G_{i\alpha}$  par la toxine pertussique (PTX) entraîne une diminution de l'activation de Src et de l'expression de Bcl-2. Cet effet est en accord avec la régulation négative de l'expression de Bcl-2 dans les lymphocytes B de souris déficientes en protéine  $G_{i\alpha}$  (Ohman et al., 2002).

Le BDNF favorise la formation de l'hétérodimère NTSR2-TrkB. En présence d'un inhibiteur de TrkB, K252a ou ANA12, l'activation de la signalisation par Src est diminuée, confirmant donc que cet effet est TrkB-dépendant. De plus, l'ajout de PTX ou de SR142948A, inhibiteur de NTSR2, en parallèle du BDNF annule l'activation de Src par le BDNF, prouvant que cet effet est également NTSR2-dépendant. Ainsi ni NTSR2 ni TrkB ne sont capables d'induire seuls une activation de Src, et l'inhibition de l'un ou l'autre des récepteurs entraîne une diminution de la signalisation par la voie Src/Akt ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Cette inhibition restaure l'apoptose des cellules leucémiques et nous estimons donc que l'inhibition de la signalisation par NTSR2-TrkB-BDNF constitue une cible prometteuse pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Les travaux décrits dans cette première partie ont été réalisés sur des LB-LLC circulants purifiés à partir de prélèvement sanguins de patients atteints de LLC. Or, la pathogénèse de la LLC est très fortement liée au MET mis en place dans les organes lymphoïdes secondaires. Au sein des ganglions de LLC, une surexpression du BDNF ainsi qu'une diminution d'expression de la neurotensine a été observée, en corrélation avec leurs concentrations plasmatiques. Nous avons donc par la suite étudié les effets des NLCs, acteurs cellulaires majeurs du MET dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse.

En co-culture avec des NLCs générées *in vitro*, les LB-LLC montrent une augmentation de l'expression du BDNF, de NTSR2 et de l'ARNm de TrkB. De plus, l'expression de la sortiline est également augmentée. La sortiline, protéine de transport intracellulaire du golgi vers la membrane plasmique (Nykjaer and Willnow, 2012b), est impliquée dans le transport antérograde des récepteurs Trks, favorisant ainsi la signalisation neurotrophique (Vaegter et al., 2011). Des travaux réalisés dans notre équipe ont également

montré l'implication de la sortiline dans les mécanismes de sécrétion du BDNF et son implication dans la mise en place d'une boucle autocrine de survie par BDNF-TrkB dans les lymphocytes B (Fauchais et al., 2008). L'augmentation d'expression dans les LB-LLC en co-culture avec les NLCs indiquerait donc une augmentation de la sécrétion de BDNF par le biais de la sortiline et ainsi une promotion de la signalisation autocrine pro-survie par l'hétérodimère NTSR2-TrkB. Par ailleurs, les NLCs générées *in vitro* expriment également le BDNF et surexpriment la sortiline par rapport aux monocytes non différenciés. Cela suggère une stimulation supplémentaire, de façon paracrine, de la signalisation induite par BDNF dans les LB-LLC.

Nous avons par la suite déterminé que la surexpression de NTSR2, BDNF et la sortiline est le résultat de la stimulation des LB-LLC par les facteurs solubles sécrétés par les NLCs CXCL12, BAFF et APRIL. Suite à la liaison de CXCL12, le récepteur CXCR4 induit une activation de la voie des MAPKs et de PI3K/Akt, aboutissant à l'activation des facteurs de transcription CREB et NF- $\kappa$ B (Cojoc et al., 2013; Joo et al., 2004; Teicher and Fricker, 2010). Ces mêmes facteurs de transcription sont également activés par la liaison de BAFF et APRIL sur leurs récepteurs (Wang et al., 1999; Zapata, 2012). Cela pourrait expliquer l'augmentation d'expression de NTSR2, qui possède un site de fixation de CREB sur son promoteur (Sun et al., 2001). La transcription du gène *NTRK2* codant pour le récepteur TrkB est également régulée par CREB (Kingsbury and Krueger, 2007). La transcription de *BDNF*, est elle aussi régulée par CREB, ainsi que par NF- $\kappa$ B (Lipsky et al., 2001; Marini et al., 2004; Tao et al., 1998). Ainsi, BAFF et APRIL pourraient réguler l'expression de NTSR2, TrkB et BDNF par l'activation de ces facteurs de transcription. Ces mécanismes de régulation ne sont pour le moment que spéculatifs et la liaison de CREB et NF- $\kappa$ B sur les promoteurs de ces gènes dans les LB-LLC co-cultivés avec des NLCs nécessite confirmation par immunoprécipitation de chromatine.

Le rôle des facteurs solubles CXCL12, BAFF et APRIL dans la promotion de la survie des LB-LLC par les NLCs avait été décrit précédemment, mais ces trois facteurs n'expliquaient pas la totalité de l'inhibition de l'apoptose observée en présence de NLCs (Burger et al., 2000; Nishio et al., 2005). L'addition du BDNF, stimulant la signalisation par NTSR2 et TrkB, dans notre étude semble rétablir le même effet anti-apoptotique que les NLCs. De plus l'inhibition du BDNF dans les co-cultures NLCs/LB-LLC annule l'effet protecteur des NLCs, confirmant le rôle primordial du BDNF dans la protection des LB-LLC contre l'apoptose.

L'ensemble de nos résultats incriminent l'interaction entre les récepteurs NTSR2 et TrkB dans les mécanismes de résistance à l'apoptose. Ces récepteurs sont transactivés suite à une stimulation par le BDNF et entraînent l'activation de la signalisation pro-survie par Src et l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Cette signalisation, caractérisée dans les LB-LLC circulants, semble accentuée en présence des NLCs. Le complexe NTSR2-TrkB-BDNF, en association avec BAFF, APRIL et CXCL12, serait ainsi mis en jeu par les NLCs pour protéger les cellules leucémiques.

## Conclusion et perspectives

---

Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence le rôle central de deux récepteurs, NTSR2 et TrkB, dans les mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules leucémiques de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique. Le récepteur couplé aux protéines G NTSR2 est surexprimé dans ces cellules et constitutivement activé malgré une diminution de la concentration plasmatique de son ligand, la neurotensine. Cette activation est le résultat de son interaction avec le récepteur à activité tyrosine kinase TrkB. Dans les cellules leucémiques, les récepteurs NTSR2 et TrkB forment un hétérodimère, stimulé par la liaison du ligand de TrkB, le BDNF, dont la concentration plasmatique augmente dans les cas de LLC. L'activation de ce complexe entraîne le recrutement, par NTSR2, d'une protéine  $G_{i\alpha}$  et l'activation des voies de signalisation pro-survie, notamment par Src et Akt. Ces voies de signalisation induisent une surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL responsables de la résistance à l'apoptose des cellules leucémiques.

Le lien entre ce complexe et les cellules du microenvironnement tumoral a également été évalué. Notre étude a montré un rôle stimulateur des NLCs sur l'expression de NTSR2 et du BDNF par les cellules leucémiques. L'expression de la sortiline, protéine régulatrice du transport intracellulaire du BDNF pour sa sécrétion et des récepteurs Trks pour leur adressage à la membrane, est également augmentée. Les NLCs, qui supportent la survie des cellules leucémiques au sein du microenvironnement par la sécrétion de CXCL12, BAFF et APRIL, produisent par ailleurs également du BDNF. Nous avons déterminé *in vitro* que CXCL12, BAFF et APRIL stimulent l'expression de NTSR2, BDNF et sortiline. L'ensemble de ces résultats suggère qu'au sein du microenvironnement, les NLCs protègent les cellules leucémiques par la promotion de la signalisation impliquant NTSR2-TrkB-BDNF.

L'interaction NTSR2-TrkB joue ainsi un rôle déterminant dans l'activation des voies de survie et la résistance des cellules leucémiques à l'apoptose. L'inhibition de l'un ou l'autre des deux récepteurs *in vitro* inhibe l'activation de ces voies, diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques et rétablit l'apoptose des cellules leucémiques. L'inhibition de NTSR2-TrkB-BDNF, en parallèle des traitements actuels, pourrait ainsi constituer une stratégie thérapeutique viable pour éliminer les cellules leucémiques résistantes à l'apoptose.

Des points restent cependant à éclaircir :

- (I) Le rôle exact de la sortiline dans le transport du BDNF et du complexe NTSR2-TrkB sera évalué par la construction de modèles cellulaires inactivés pour la sortiline. Par ailleurs, ces modèles permettront de confirmer nos résultats préliminaires indiquant une régulation potentielle de BAFF et APRIL ainsi que de leurs récepteurs par la sortiline. L'un des rôles de la sortiline étant également de réguler la sécrétion d'exosomes, elle pourrait donc jouer un rôle central dans la communication entre les cellules leucémiques et les cellules du microenvironnement tumoral, ainsi que dans les mécanismes de survie (Dubovsky et al., 2013) et d'échappement immunitaire (Reiners et al., 2013) dépendants des exosomes dans la LLC.
- (II) Le *homing* des cellules leucémiques vers les organes lymphoïdes secondaires est essentiel aux interactions de ces cellules avec les cellules du microenvironnement tumoral. Par conséquent, une éventuelle implication de NTSR2-TrkB-BDNF et de la sortiline dans ces mécanismes de *homing* sera recherchée.
- (III) La régulation de l'expression de Bcl-2 par la signalisation induite par NTSR2-TrkB ne semble pas être transcriptionnelle, les mécanismes de régulation post-transcriptionnels et post-traductionnels de Bcl-2 (Willimott and Wagner, 2010) en réponse à cette signalisation seront donc étudiés.
- (IV) La surexpression de NTSR2 ne semble liée à aucun des facteurs de risque mais est stimulée par le contact avec les NLCs. Nous déterminerons si cette surexpression est un évènement précoce dans le développement de la LLC ou la conséquence du contact des cellules leucémiques avec le microenvironnement tumoral après sa mise en place. Les éventuelles modifications épigénétiques dans le promoteur de NTSR2 et les facteurs de transcription s'y fixant seront étudiées.
- (V) L'efficacité de nouveaux inhibiteurs de NTSR2 (Einsiedel et al., 2011; Thomas et al., 2014), plus sélectifs de NTSR2, sera évaluée sur les cellules leucémiques seules ou en co-culture avec des NLCs, afin de confirmer l'intérêt thérapeutique potentiel de ce récepteur.
- (VI) Nos résultats préliminaires font également l'état d'une expression des récepteurs TrkB et NTSR2. Un éventuel rôle dans les mécanismes de survie des NLCs et dans la mise en place du microenvironnement tumoral de la LLC doit être évalué.



Nos résultats ont donc montré l'importance de la signalisation induite par le complexe NTSR2-TrkB, stimulé par le BDNF, pour la survie des lymphocytes B leucémiques de patients atteints de LLC. Les NLCs semblent promouvoir la signalisation par ce complexe, qui jouerait ainsi un rôle à la fois dans les cellules leucémiques circulantes et au sein du microenvironnement. Ce mécanisme de survie aberrante des cellules leucémiques nouvellement identifié pourrait constituer un élément majeur de la pathogénèse de la LLC et un nouveau champ d'investigation pour le développement thérapeutique.

## Références bibliographiques

---

Acebes-Huerta, A., Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A.P., Fernandez-Guizan, A., Payer, A.R., López-Soto, A., and Gonzalez, S. (2014). Lenalidomide induces immunomodulation in chronic lymphocytic leukemia and enhances antitumor immune responses mediated by NK and CD4 T cells. *Biomed Res Int* 2014, 265840.

Ahmed, F., Tessarollo, L., Thiele, C., and Mocchetti, I. (2008). Brain-derived neurotrophic factor modulates expression of chemokine receptors in the brain. *Brain Res.* 1227, 1–11.

Ahn, I.E., Underbayev, C., Albitar, A., Herman, S.E.M., Tian, X., Maric, I., Arthur, D.C., Wake, L., Pittaluga, S., Yuan, C.M., et al. (2017). Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 129, 1469–1479.

Ali, K., Soond, D.R., Pineiro, R., Hagemann, T., Pearce, W., Lim, E.L., Bouabe, H., Scudamore, C.L., Hancox, T., Maecker, H., et al. (2014). Inactivation of PI(3)K p110 $\delta$  breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature* 510, 407–411.

Alifano, M., Souazé, F., Dupouy, S., Camilleri-Broët, S., Younes, M., Ahmed-Zaïd, S.-M., Takahashi, T., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M., et al. (2010). Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 4401–4410.

Allavena, P., and Mantovani, A. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical & Experimental Immunology* 167, 195–205.

Allavena, P., Chieppa, M., Bianchi, G., Solinas, G., Fabbri, M., Laskarin, G., and Mantovani, A. (2010). Engagement of the Mannose Receptor by Tumoral Mucins Activates an Immune Suppressive Phenotype in Human Tumor-Associated Macrophages.

Almenoff, J., Wilk, S., and Orłowski, M. (1981). Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 206–214.

Alshoukr, F., Rosant, C., Maes, V., Abdelhak, J., Raguin, O., Burg, S., Sarda, L., Barbet, J., Tourwé, D., Pelaprat, D., et al. (2009). Novel neurotensin analogues for radioisotope targeting to neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug. Chem.* 20, 1602–1610.

Alshoukr, F., Prignon, A., Brans, L., Jallane, A., Mendes, S., Talbot, J.-N., Tourwé, D., Barbet, J., and Gruaz-Guyon, A. (2011). Novel DOTA-neurotensin analogues for <sup>111</sup>In scintigraphy and <sup>68</sup>Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug. Chem.* 22, 1374–1385.

Amorino, G.P., Deeble, P.D., and Parsons, S.J. (2007). Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene* 26, 745–756.

Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., and Schlessinger, J. (2001). Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 276, 20130–20135.

Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Förster, R., Sedgwick, J.D., Browning, J.L., Lipp, M., and Cyster, J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes

lymphoid follicles. *Nature* 406, 309–314.

Arango-Rodriguez, M.L., Navarro-Quiroga, I., Gonzalez-Barrios, J.A., Martinez-Arguelles, D.B., Bannon, M.J., Kouri, J., Forgez, P., Rostene, W., Garcia-Villegas, R., Jimenez, I., et al. (2006). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760, 1009–1020.

Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1523–1537.

Audrito, V., Serra, S., Brusa, D., Mazzola, F., Arruga, F., Vaisitti, T., Coscia, M., Maffei, R., Rossi, D., Wang, T., et al. (2015). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 125, 111–123.

Aue, G., Njuguna, N., Tian, X., Soto, S., Hughes, T., Vire, B., Keyvanfar, K., Gibellini, F., Valdez, J., Boss, C., et al. (2009). Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 94, 1266–1273.

Austen, B., Powell, J.E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A.M.R., Fegan, C., Moss, P., and Stankovic, T. (2005). Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 106, 3175–3182.

Austen, B., Skowronska, A., Baker, C., Powell, J.E., Gardiner, A., Oscier, D., Majid, A., Dyer, M., Siebert, R., Taylor, A.M., et al. (2007). Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J. Clin. Oncol.* 25, 5448–5457.

Avalos, A.M., Meyer-Wentrup, F., and Ploegh, H.L. (2014). B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies and autoimmunity. *Adv. Immunol.* 123, 1–49.

Avdoshina, V., Becker, J., Campbell, L.A., Parsadonian, M., Mhyre, T., Tessarollo, L., and Mocchetti, I. (2011). Neurotrophins modulate the expression of chemokine receptors in the brain. *J Neurovirol* 17, 58–62.

Ayala-Sarmiento, A.E., Martinez-Fong, D., and Segovia, J. (2015). The Internalization of Neurotensin by the Low-Affinity Neurotensin Receptors (NTSR2 and vNTSR2) Activates ERK 1/2 in Glioma Cells and Allows Neurotensin-Polyplex Transfection of tGAS1. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 785–795.

Azoulay, D., Herishanu, Y., Shapiro, M., Brandshaft, Y., Suriu, C., Akria, L., and Braester, A. (2018). Elevated serum BDNF levels are associated with favorable outcome in CLL patients: Possible link to CXCR4 downregulation. *Experimental Hematology* 63, 17-21.e1.

Bagacean, C., Tempescul, A., Le Dantec, C., Bordron, A., Mohr, A., Saad, H., Olivier, V., Zdrengea, M., Cristea, V., Cartron, P.-F., et al. (2017a). Alterations in DNA methylation/demethylation intermediates predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 8, 65699–65716.

Bagacean, C., Zdrengea, M., Dantec, C.L., Tempescul, A., Berthou, C., and Renaudineau, Y. (2017b). DNA demethylation marks in chronic lymphocytic leukemia: it is time to let the cat

out of the bag. *Future Sci OA* 4.

Bakirtzi, K., Hatzia Apostolou, M., Karagiannides, I., Polytarchou, C., Jaeger, S., Iliopoulos, D., and Pothoulakis, C. (2011). Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors. *Gastroenterology* 141, 1749-1761.e1.

Balatti, V., Bottoni, A., Palamarchuk, A., Alder, H., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., Pekarsky, Y., and Croce, C.M. (2012). NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119, 329-331.

Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L.-A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., Larrayoz, M., Kminkova, J., Agathangelidis, A., Davis, Z., et al. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29, 329-336.

Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell. Sci.* 125, 5591-5596.

Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-553.

Baumann Kreuziger, L.M., Tarchand, G., and Morrison, V.A. (2014). The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 55, 63-66.

Beissert, S., Hosoi, J., Grabbe, S., Asahina, A., and Granstein, R.D. (1995). IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology* 154, 1280-1286.

Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313-325.

Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., and Troutaud, D. (2011). Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS ONE* 6, e27213.

Benjamini, O., Jain, P., Trinh, L., Qiao, W., Strom, S.S., Lerner, S., Wang, X., Burger, J., Ferrajoli, A., Kantarjian, H., et al. (2015). Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leuk. Lymphoma* 56, 1643-1650.

Béraud-Dufour, S., Coppola, T., Massa, F., and Mazella, J. (2009). Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2398-2402.

Bergelin, N., Löf, C., Balthasar, S., Kalhori, V., and Törnquist, K. (2010). S1P1 and VEGFR-2 form a signaling complex with extracellularly regulated kinase 1/2 and protein kinase C-alpha regulating ML-1 thyroid carcinoma cell migration. *Endocrinology* 151, 2994-3005.

Bergman, E., Ulfhake, B., and Fundin, B.T. (2000). Regulation of NGF-family ligands and receptors in adulthood and senescence: correlation to degenerative and regenerative changes in cutaneous innervation. *European Journal of Neuroscience* 12, 2694-2706.

- Bernard-Gauthier, V., and Schirmmacher, R. (2016). Evaluation of WO2015042088 A1 - a novel urea-based scaffold for TrkA inhibition. *Expert Opin Ther Pat* 26, 291–295.
- Berndt, S.I., Skibola, C.F., Joseph, V., Camp, N.J., Nieters, A., Wang, Z., Cozen, W., Monnereau, A., Wang, S.S., Kelly, R.S., et al. (2013). Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 45, 868–876.
- Besser, M., and Wank, R. (1999). Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J. Immunol.* 162, 6303–6306.
- Besserer-Offroy, É., Brouillette, R.L., Lavenus, S., Froehlich, U., Brumwell, A., Murza, A., Longpré, J.-M., Marsault, É., Grandbois, M., Sarret, P., et al. (2017). The signaling signature of the neurotensin type 1 receptor with endogenous ligands. *European Journal of Pharmacology* 805, 1–13.
- Beutel, G., Meyer, J., Ma, L., Yin, S., Eder, M., von Neuhoff, N., Wilkens, L., Wei, J., Hertenstein, B., Heil, G., et al. (2005). Expression of the p75 neurotrophin receptor in acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* 131, 67–70.
- Beyer, M., Kochanek, M., Darabi, K., Popov, A., Jensen, M., Endl, E., Knolle, P.A., Thomas, R.K., Bergwelt-Baildon, M. von, Debey, S., et al. (2005). Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 106, 2018–2025.
- Bhattacharya, N., Diener, S., Idler, I.S., Barth, T.F., Rauen, J., Habermann, A., Zenz, T., Möller, P., Döhner, H., Stilgenbauer, S., et al. (2011a). Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia* 25, 722–726.
- Bhattacharya, N., Diener, S., Idler, I.S., Rauen, J., Häbe, S., Busch, H., Habermann, A., Zenz, T., Döhner, H., Stilgenbauer, S., et al. (2011b). Nurse-like cells show deregulated expression of genes involved in immunocompetence: Deregulation of Immunocompetence Genes in Nurse-Like Cells. *British Journal of Haematology* 154, 349–356.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., et al. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48, 198–206.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11, 889–896.
- Blair, A., and White, D.W. (1985). Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. *Arch. Environ. Health* 40, 211–214.
- Bo, M.D., Del Principe, M.I., Pozzo, F., Ragusa, D., Bulian, P., Rossi, D., Capelli, G., Rossi, F.M., Niscola, P., Buccisano, F., et al. (2014). NOTCH1 mutations identify a chronic lymphocytic leukemia patient subset with worse prognosis in the setting of a rituximab-based induction and consolidation treatment. *Ann Hematol* 93, 1765–1774.

- Boggs, D.R., Chen, S.C., Zhang, Z.N., and Zhang, A. (1987). Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am. J. Hematol.* *25*, 349–354.
- Boissard, F., Fournié, J.-J., Quillet-Mary, A., Ysebaert, L., and Poupot, M. (2015a). Nurse-like cells mediate ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood Cancer Journal* *5*, e355–e355.
- Boissard, F., Fournié, J.-J., Laurent, C., Poupot, M., and Ysebaert, L. (2015b). Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages. *Leukemia & Lymphoma* *56*, 1570–1572.
- Boissard, F., Tosolini, M., Ligat, L., Quillet-Mary, A., Lopez, F., Fournié, J.-J., Ysebaert, L., Poupot, M., Boissard, F., Tosolini, M., et al. (2016). Nurse-like cells promote CLL survival through LFA-3/CD2 interactions. *Oncotarget* *8*, 52225–52236.
- Bonnert, T.P., Garka, K.E., Parnet, P., Sonoda, G., Testa, J.R., and Sims, J.E. (1997). The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family 1. *FEBS Letters* *402*, 81–84.
- Bordron, A., Bagacean, C., Mohr, A., Tempescul, A., Bendaoud, B., Deshayes, S., Dalbies, F., Buors, C., Saad, H., Berthou, C., et al. (2018). Resistance to complement activation, cell membrane hypersialylation and relapses in chronic lymphocytic leukemia patients treated with rituximab and chemotherapy. *Oncotarget* *9*, 31590–31605.
- Bossard, N., Velten, M., Remontet, L., Belot, A., Maarouf, N., Bouvier, A.M., Guizard, A.V., Tretarre, B., Launoy, G., Colonna, M., et al. (2007). Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). *Eur. J. Cancer* *43*, 149–160.
- Botto, J.M., Chabry, J., Sarret, P., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1998). Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *243*, 585–590.
- Boules, M., Li, Z., Smith, K., Fredrickson, P., and Richelson, E. (2013). Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)* *4*, 36.
- Boven, L.A., Middel, J., Portegies, P., Verhoef, J., Jansen, G.H., and Nottet, H.S. (1999). Overexpression of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor in AIDS dementia complex. *J. Neuroimmunol.* *97*, 154–162.
- Bozzola, M., Thome, A.N., Giraldi, E., Lhiaubet, A.M., and Schimpff, R.M. (1998). Plasma neurotensin levels in prepubertal children and adults: possible involvement in the regulation of growth hormone secretion. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* *11*, 615–621.
- Breuza, L., Garcia, M., Delgrossi, M.-H., and Le Bivic, A. (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp. Cell Res.* *273*, 178–186.
- Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009a). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3244–3250.
- Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E.,

- Kolla, V., and Evans, A.E. (2009b). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3244–3250.
- Brodie, C., and Gelfand, E.W. (1992). Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *The Journal of Immunology* *148*, 3492–3497.
- Brodie, C., Oshiba, A., Renz, H., Bradley, K., and Gelfand, E.W. (1996). Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *26*, 171–178.
- Brown, J.R. (2013). Inherited susceptibility to chronic lymphocytic leukemia: evidence and prospects for the future. *Ther Adv Hematol* *4*, 298–308.
- Brown, J.R., Neuberg, D., Phillips, K., Reynolds, H., Silverstein, J., Clark, J.C., Ash, M., Thompson, C., Fisher, D.C., Jacobsen, E., et al. (2008). Prevalence of familial malignancy in a prospectively screened cohort of patients with lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* *143*, 361–368.
- Brown, J.R., Byrd, J.C., Coutre, S.E., Benson, D.M., Flinn, I.W., Wagner-Johnston, N.D., Spurgeon, S.E., Kahl, B.S., Bello, C., Webb, H.K., et al. (2014). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\delta$ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *123*, 3390–3397.
- Brown, L.M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G.D., Cantor, K.P., Schuman, L.M., Burmeister, L.F., Van Lier, S.F., and Dick, F. (1990). Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* *50*, 6585–6591.
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* *19*, 57–64.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* *96*, 857–868.
- Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K., and Salih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Immunology* *42*, 737–748.
- Buggins, A.G.S., and Pepper, C.J. (2010). The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Res.* *34*, 837–842.
- Burger, J.A. (2011). Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology* *2011*, 96–103.
- Burger, J.A. (2013). The CLL Cell Microenvironment. In *Advances in Chronic Lymphocytic Leukemia*, S. Malek, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 25–45.
- Burger, J.A., and Buggy, J.J. (2013). Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765). *Leuk. Lymphoma* *54*, 2385–2391.
- Burger, J.A., and Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in Immunology* *34*, 592–601.

- Burger, J.A., and O'Brien, S. (2018). Evolution of CLL treatment - from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 510–527.
- Burger, J.A., Burger, M., and Kipps, T.J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 94, 3658–3667.
- Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., and 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.
- Burger, J.A., Quiroga, M.P., Hartmann, E., Bürkle, A., Wierda, W.G., Keating, M.J., and Rosenwald, A. (2009). High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 113, 3050–3058.
- Burger, J.A., Tedeschi, A., Barr, P.M., Robak, T., Owen, C., Ghia, P., Bairey, O., Hillmen, P., Bartlett, N.L., Li, J., et al. (2015). Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 373, 2425–2437.
- Burger, J.A., Landau, D.A., Taylor-Weiner, A., Bozic, I., Zhang, H., Sarosiek, K., Wang, L., Stewart, C., Fan, J., Hoellenriegel, J., et al. (2016). Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun* 7, 11589.
- Burger, J.A., Li, K.W., Keating, M.J., Sivina, M., Amer, A.M., Garg, N., Ferrajoli, A., Huang, X., Kantarjian, H., Wierda, W.G., et al. (2017). Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *JCI Insight* 2.
- Bürkle, A., Niedermeier, M., Schmitt-Gräff, A., Wierda, W.G., Keating, M.J., and Burger, J.A. (2007). Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 110, 3316–3325.
- Burton, J.D., Weitz, C.H., and Kay, N.E. (1989). Malignant chronic lymphocytic leukemia B cells elaborate soluble factors that down-regulate T cell and NK function. *American Journal of Hematology* 30, 61–67.
- Byrd, J.C., Furman, R.R., Coutre, S.E., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K.A., Grant, B., Sharman, J.P., Coleman, M., Wierda, W.G., et al. (2013). Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia.
- Bystry, R.S., Aluvihare, V., Welch, K.A., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2001). B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol.* 2, 1126–1132.
- Cahill, N., and Rosenquist, R. (2013). Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 8, 138–148.
- Caligaris-Cappio, F. (2003). Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 123, 380–388.
- Caligaris-Cappio, F. (2009). Chronic Lymphocytic Leukemia: “Cinderella” Is Becoming a Star. *Mol Med* 15, 67–69.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S.,



- Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 99, 15524–15529.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., et al. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1793–1801.
- Calissano, C., Damle, R.N., Hayes, G., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Moreno, C., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., et al. (2009a). In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114, 4832–4842.
- Calissano, C., Damle, R.N., Yan, X.J., Li, W., Marsilio, S., Kolitz, J.E., Kaufman, M.S., Allen, S.L., Rai, K.R., and Chiorazzi, N. (2009b). Multi-Parameter Phenotypic Analysis of Members of Chronic Lymphocytic Leukemia Clones Identifies Distinct Proliferative and Resting/Re-Entry Compartments with Discrete Gene Expression Profiles. *Blood* 114, 668–668.
- Calissano, C., Damle, R.N., Marsilio, S., Yan, X.-J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Sison, C., et al. (2011). Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol. Med.* 17, 1374–1382.
- Campregher, P.V., and Hamerschlak, N. (2014). Novel Prognostic Gene Mutations Identified in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Impact on Clinical Practice. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 14, 271–276.
- Capalbo, S., Trerotoli, P., Ciancio, A., Battista, C., Serio, G., and Liso, V. (2000). Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur. J. Haematol.* 65, 114–117.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* 248, 6854–6861.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1975). The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J. Biol. Chem.* 250, 1907–1911.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1976). Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach. *J. Biol. Chem.* 251, 7045–7052.
- Carraway, R.E., and Mitra, S.P. (1994). Binding and biologic activity of neurotensin in guinea pig ileum. *Peptides* 15, 1451–1459.
- Carraway, R.E., and Plona, A.M. (2006). Involvement of neurotensin in cancer growth: Evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 27, 2445–2460.
- Cassiman, D., Denef, C., Desmet, V.J., and Roskams, T. (2001). Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 33, 148–158.
- Castagliuolo, I., Wang, C.C., Valenick, L., Pasha, A., Nikulasson, S., Carraway, R.E., and Pothoulakis, C. (1999). Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic

inflammation. *J. Clin. Invest.* *103*, 843–849.

Castillo-Rodríguez, R.A., Arango-Rodríguez, M.L., Escobedo, L., Hernandez-Baltazar, D., Gompel, A., Forgez, P., and Martínez-Fong, D. (2014). Suicide HSVtk Gene Delivery by Neurotensin-Polyplex Nanoparticles via the Bloodstream and GCV Treatment Specifically Inhibit the Growth of Human MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Tumors Xenografted in Athymic Mice. *PLoS One* *9*.

Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4120–4125.

Catovsky, D., Fooks, J., and Richards, S. (1989). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br. J. Haematol.* *72*, 141–149.

Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., and Ammendola, R. (2014a). Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* *15*, 19700–19728.

Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., and Ammendola, R. (2014b). Cell-Surface Receptors Transactivation Mediated by G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci* *15*, 19700–19728.

Caux, C., Ramos, R.N., Prendergast, G.C., Bendriss-Vermare, N., and Ménétrier-Caux, C. (2016). A Milestone Review on How Macrophages Affect Tumor Growth. *Cancer Res* *76*, 6439–6442.

Chakravarthy, R., Mnich, K., and Gorman, A.M. (2016). Nerve growth factor (NGF)-mediated regulation of p75(NTR) expression contributes to chemotherapeutic resistance in triple negative breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *478*, 1541–1547.

Chanan-Khan, A., and Porter, C.W. (2006). Immunomodulating drugs for chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet Oncology* *7*, 480–488.

Chanput, W., Mes, J.J., and Wichers, H.J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* *23*, 37–45.

Chantepie, S., Krieger, S., and Leporrier, M. (2012). Méthylation dans les hémopathies malignes : techniques et perspectives. *Hématologie* *18*, 124–132.

Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 299–309.

Chao, M.V., and Bothwell, M. (2002). Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* *33*, 9–12.

Chapiro, E., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Luquet, I., Lefebvre, C., Callet-Bauchu, E., Leroux, D., Talmant, P., Mozziconacci, M.-J., Mugneret, F., et al. (2008). The most frequent t(14;19)(q32;q13)-positive B-cell malignancy corresponds to an aggressive subgroup of atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *22*, 2123–2127.

Chapiro, E., Leporrier, N., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Mossafa, H., Leroux, D., Tigaud,

- I., De Braekeleer, M., Terré, C., Brizard, F., et al. (2010). Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk. Res.* *34*, 63–68.
- Checler, F., Vincent, J.P., and Kitabgi, P. (1986). Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* *261*, 11274–11281.
- Chen, J., Chen, J.-K., and Harris, R.C. (2012). Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 981–991.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 4609–4614.
- Chen, L., Huynh, L., Apgar, J., Tang, L., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2008). ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *111*, 2685–2692.
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D.G., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., and Lee, F.S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci.* *25*, 6156–6166.
- Chiaretti, S., Marinelli, M., Giudice, I.D., Bonina, S., Piciocchi, A., Messina, M., Vignetti, M., Rossi, D., Maio, V.D., Mauro, F.R., et al. (2014). NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leukemia & Lymphoma* *55*, 2785–2792.
- Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2003). B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Lessons Learned from Studies of the B Cell Antigen Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 841–894.
- Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2011). Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* *117*, 1781–1791.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *352*, 804–815.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010–1014.
- Choi, M.Y., Kashyap, M.K., and Kumar, D. (2016). The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract Res Clin Haematol* *29*, 40–53.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 13944–13949.
- Clarke, C.A., Glaser, S.L., Gomez, S.L., Wang, S.S., Keegan, T.H., Yang, J., and Chang, E.T. (2011). Lymphoid malignancies in US Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *20*, 1064–1077.

- Cochrane, D.E., Carraway, R.E., Harrington, K., Laudano, M., Rawlings, S., and Feldberg, R.S. (2011). HMC-1 human mast cells synthesize neurotensin (NT) precursor, secrete bioactive NT-like peptide(s) and express NT receptor NTS1. *Inflamm. Res.* *60*, 1139–1151.
- Coelho, V., Krysov, S., Steele, A., Sanchez Hidalgo, M., Johnson, P.W., Chana, P.S., Packham, G., Stevenson, F.K., and Forconi, F. (2013). Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood* *122*, 2664–2672.
- Coffelt, S.B., Hughes, R., and Lewis, C.E. (2009). Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* *1796*, 11–18.
- Coffelt, S.B., Tal, A.O., Scholz, A., De Palma, M., Patel, S., Urbich, C., Biswas, S.K., Murdoch, C., Plate, K.H., Reiss, Y., et al. (2010). Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res.* *70*, 5270–5280.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954). A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180\*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *40*, 1014–1018.
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Trautmann, F., Polishchuk, L., Telegeev, G.D., and Dubrovskaya, A. (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Oncotargets Ther* *6*, 1347–1361.
- Collins, R.J., Verschuer, L.A., Harmon, B.V., Prentice, R.L., Pope, J.H., and Kerr, J.F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.* *71*, 343–350.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* *30*, 1073–1081.
- Cols, M., Barra, C.M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D.M., Dillon, S.R., Leonard, J.P., et al. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J. Immunol.* *188*, 6071–6083.
- Contri, A., Brunati, A.M., Trentin, L., Cabrelle, A., Miorin, M., Cesaro, L., Pinna, L.A., Zambello, R., Semenzato, G., and Donella-Deana, A. (2005). Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest* *115*, 369–378.
- Cooper, P.E., Fernstrom, M.H., Rorstad, O.P., Leeman, S.E., and Martin, J.B. (1981). The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res.* *218*, 219–232.
- Corbit, K.C., Foster, D.A., and Rosner, M.R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4209–4218.
- Cosson, A., Chapiro, E., Bougacha, N., Lambert, J., Herbi, L., Cung, H.-A., Algrin, C., Keren, B., Damm, F., Gabillaud, C., et al. (2017). Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of

the central role of XPO1. *Leukemia* 31, 1625–1629.

Cramer, P., and Hallek, M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol* 8, 38–47.

Cramer, P., Langerbeins, P., Eichhorst, B., and Hallek, M. (2016). Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study Group (GCLLSG). *Eur. J. Haematol.* 96, 9–18.

Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 1764–1775.

Croci, D.O., Morande, P.E., Dergan-Dylon, S., Borge, M., Toscano, M.A., Stupirski, J.C., Bezares, R.F., Avalos, J.S., Narbaitz, M., Gamberale, R., et al. (2013). Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia* 27, 1413–1416.

Croucher, J.L., Iyer, R., Li, N., Molteni, V., Loren, J., Gordon, W.P., Tuntland, T., Liu, B., and Brodeur, G.M. (2015). TrkB Inhibition by GNF-4256 Slows Growth and Enhances Chemotherapeutic Efficacy in Neuroblastoma Xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 75, 131–141.

Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Di Bernardo, M.C., Dobbins, S.E., Torres, M., Mansouri, M., Ruiz-Ponte, C., Enjuanes, A., Rosenquist, R., Carracedo, A., et al. (2010). Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat. Genet.* 42, 132–136.

Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* 41, 599–613.

Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1840–1847.

Damle, R.N., Temburni, S., Calissano, C., Yancopoulos, S., Banapour, T., Sison, C., Allen, S.L., Rai, K.R., and Chiorazzi, N. (2007). CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 110, 3352–3359.

D’Arena, G., and Musto, P. (2014). Monoclonal B-Cell Lymphocytosis. *Transl Med UniSa* 8, 75–79.

D’arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Dell’olio, M., Renzo, N. di, Perla, G., Savino, L., and Carotenuto, M. (2001). CD38 Expression Correlates with Adverse Biological Features and Predicts Poor Clinical Outcome in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 42, 109–114.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

Davis, M.J., Tsang, T.M., Qiu, Y., Dayrit, J.K., Freij, J.B., Huffnagle, G.B., and Olszewski,

- M.A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* 4, e00264-00213.
- De la Fuente, M., Garrido, J.J., Arahuetes, R.M., and Hernanz, A. (1993). Stimulation of phagocytic function in mouse macrophages by neurotensin and neuromedin N. *J. Neuroimmunol.* 42, 97–104.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Bergui, L., Bonello, L., Horenstein, A.L., Tamagnone, L., Bounsell, L., and Malavasi, F. (2005). CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 105, 3042–3050.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Aydin, S., Bergui, L., D’Arena, G., Bonello, L., Omedé, P., Scatolini, M., Jaksic, O., Chiorino, G., et al. (2007). CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 110, 4012–4021.
- Dechant, G. (2001). Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res* 305, 229–238.
- Defoiche, J., Debacq, C., Asquith, B., Zhang, Y., Burny, A., Bron, D., Lagneaux, L., Macallan, D., and Willems, L. (2008). Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 143, 240–247.
- Del Poeta, G., Dal Bo, M., Del Principe, M.I., Pozzo, F., Rossi, F.M., Zucchetto, A., Bomben, R., Degan, M., Rasi, S., Rossi, D., et al. (2013). Clinical significance of c.7544-7545 delCT NOTCH1 mutation in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 160, 415–418.
- Delgado, J., Pratt, G., Phillips, N., Briones, J., Fegan, C., Nomdedeu, J., Pepper, C., Aventin, A., Ayats, R., Brunet, S., et al. (2009). Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br. J. Haematol.* 145, 801–805.
- Demir, I.E., Tieftrunk, E., Schorn, S., Friess, H., and Ceyhan, G.O. (2016). Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1866, 37–50.
- Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Le Bourhis, X., Toillon, R.-A., Bradshaw, R.A., and Hondermarck, H. (2012). Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J. Biol. Chem.* 287, 1923–1931.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Anderson, J., and May, W.S. (2006). Bcl2’s flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4421–4434.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100, 194–199.
- Di Raimondo, F., Giustolisi, R., Lerner, S., Cacciola, E., O’Brien, S., Kantarjian, H., and Keating, M.J. (2001). Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann. Oncol.* 12, 621–625.
- Dicou, E., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2004). Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J. Neurosci. Res.* 78, 92–99.
- Dighiero, G., and Hamblin, T.J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 371, 1017–

1029.

Ding, W., Knox, T.R., Tschumper, R.C., Wu, W., Schwager, S.M., Boysen, J.C., Jelinek, D.F., and Kay, N.E. (2010). Platelet-derived growth factor (PDGF)–PDGF receptor interaction activates bone marrow–derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood* 116, 2984–2993.

Ding, W., LaPlant, B.R., Call, T.G., Parikh, S.A., Leis, J.F., He, R., Shanafelt, T.D., Sinha, S., Le-Rademacher, J., Feldman, A.L., et al. (2017). Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood* 129, 3419–3427.

Dobner, P.R. (2005). Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1946–1963.

Dobner, P.R. (2006). Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 27, 2405–2414.

Doebele, R.C., Davis, L.E., Vaishnavi, A., Le, A.T., Estrada-Bernal, A., Keysar, S., Jimeno, A., Varella-Garcia, M., Aisner, D.L., Li, Y., et al. (2015). An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov* 5, 1049–1057.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., James, M.R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., Fischer, K., Hunstein, W., and Lichter, P. (1997). 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89, 2516–2522.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 343, 1910–1916.

Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386, 855–858.

Dong, Z., Lei, Q., Yang, R., Zhu, S., Ke, X.-X., Yang, L., Cui, H., and Yi, L. (2017). Inhibition of neurotensin receptor 1 induces intrinsic apoptosis via let-7a-3p/Bcl-w axis in glioblastoma. *Br. J. Cancer* 116, 1572–1584.

Dubonet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., et al. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br. J. Cancer* 113, 934–944.

Dubovsky, J.A., Chappell, D.L., Harrington, B.K., Agrawal, K., Andritsos, L.A., Flynn, J.M., Jones, J.A., Paulaitis, M.E., Bolon, B., Johnson, A.J., et al. (2013). Lymphocyte cytosolic protein 1 is a chronic lymphocytic leukemia membrane-associated antigen critical to niche homing. *Blood* 122, 3308–3316.

Dubuc, I., Sarret, P., Labbé-Jullié, C., Botto, J.M., Honoré, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J.P., Kitabgi, P., et al. (1999). Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J. Neurosci.* 19, 503–510.

Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., et al. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6

skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* *110*, 4319–4330.

Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Alifano, M., Souazé, F., Plu-Bureau, G., Chaouat, M., Lavour, A., Hugol, D., Gespach, C., Gompel, A., et al. (2009). The Neurotensin Receptor-1 Pathway Contributes to Human Ductal Breast Cancer Progression. *PLOS ONE* *4*, e4223.

Dupouy, S., Mourra, N., Doan, V.K., Gompel, A., Alifano, M., and Forgez, P. (2011). The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* *93*, 1369–1378.

Dupouy, S., Doan, V.K., Wu, Z., Mourra, N., Liu, J., De Wever, O., Llorca, F.P., Cayre, A., Kouchkar, A., Gompel, A., et al. (2014). Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* *5*, 8235–8251.

Dürig, J., Naschar, M., Schmücker, U., Renzing-Köhler, K., Hölter, T., Hüttmann, A., and Dührsen, U. (2002). CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* *16*, 30–35.

Edwards V, D.K., Sweeney, D.T., Ho, H., Eide, C.A., Rofelty, A., Agarwal, A., Liu, S.Q., Danilov, A.V., Lee, P., Chantry, D., et al. (2018). Targeting of colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) in the CLL microenvironment yields antineoplastic activity in primary patient samples. *Oncotarget* *9*, 24576–24589.

Eggert, A., Sieverts, H., Ikegaki, N., and Brodeur, G.M. (2000). p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Med. Pediatr. Oncol.* *35*, 573–576.

Ehrhard, P.B., Ganter, U., Stalder, A., Bauer, J., and Otten, U. (1993). Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 5423–5427.

Eichhorst, B., Dreyling, M., Robak, T., Montserrat, E., Hallek, M., and ESMO Guidelines Working Group (2011). Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *22 Suppl 6*, vi50-54.

Eichhorst, B., Fink, A.-M., Bahlo, J., Busch, R., Kovacs, G., Maurer, C., Lange, E., Köppler, H., Kiehl, M., Sökler, M., et al. (2016). First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* *17*, 928–942.

Einsiedel, J., Held, C., Hervet, M., Plomer, M., Tschammer, N., Hübner, H., and Gmeiner, P. (2011). Discovery of highly potent and neurotensin receptor 2 selective neurotensin mimetics. *J. Med. Chem.* *54*, 2915–2923.

El Zein, N., D'Hondt, S., and Sariban, E. (2010). Crosstalks between the receptors tyrosine kinase EGFR and TrkA and the GPCR, FPR, in human monocytes are essential for receptors-mediated cell activation. *Cell. Signal.* *22*, 1437–1447.

El-Shewy, H.M., Abdel-Samie, S.A., Al Qalam, A.M., Lee, M.-H., Kitatani, K., Anelli, V., Jaffa, A.A., Obeid, L.M., and Luttrell, L.M. (2011). Phospholipase C and protein kinase C-β 2 mediate insulin-like growth factor II-dependent sphingosine kinase 1 activation. *Mol. Endocrinol.* *25*, 2144–2156.



- Erreni, M., Mantovani, A., and Allavena, P. (2010). Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron* 4, 141–154.
- Escamilla, J., Schokrpur, S., Liu, C., Priceman, S.J., Moughon, D., Jiang, Z., Pouliot, F., Magyar, C., Sung, J.L., Xu, J., et al. (2015). CSF1 receptor targeting in prostate cancer reverses macrophage-mediated resistance to androgen blockade therapy. *Cancer Res.* 75, 950–962.
- Esposito, G., Perrino, C., Cannavo, A., Schiattarella, G.G., Borgia, F., Sannino, A., Pironti, G., Gargiulo, G., Di Serafino, L., Franzone, A., et al. (2011). EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by  $\beta$ -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res. Cardiol.* 106, 577–589.
- Evers, B.M., Bold, R.J., Ehrenfried, J.A., Li, J., Townsend, C.M., and Klimpel, G.R. (1994). Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes. *Surgery* 116, 134–139; discussion 139-140.
- Evrard, S., Gaussem, P., Helley, D., and Darnige, L. (2005). Facteurs pronostiques de la leucémie lymphoïde chronique : apport des marqueurs biologiques récents. *Ann Biol Clin* 63, 9.
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabani, H., Ma, J., Grunn, A., Fangazio, M., Capello, D., Monti, S., et al. (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *Journal of Experimental Medicine* 208, 1389–1401.
- Fabris, S., Mosca, L., Cutrona, G., Lionetti, M., Agnelli, L., Ciceri, G., Barbieri, M., Maura, F., Matis, S., Colombo, M., et al. (2013). Chromosome 2p gain in monoclonal B-cell lymphocytosis and in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 88, 24–31.
- Faderl, S., Keating, M.J., Do, K.-A., Liang, S.-Y., Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Manshouri, T., and Albitar, M. (2002). Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 16, 1045–1052.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z., et al. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 102, 1515–1525.
- Falciani, C., Brunetti, J., Pagliuca, C., Menichetti, S., Vitellozzi, L., Lelli, B., Pini, A., and Bracci, L. (2010a). Design and in vitro evaluation of branched peptide conjugates: turning nonspecific cytotoxic drugs into tumor-selective agents. *ChemMedChem* 5, 567–574.
- Falciani, C., Lelli, B., Brunetti, J., Pileri, S., Cappelli, A., Pini, A., Pagliuca, C., Ravenni, N., Bencini, L., Menichetti, S., et al. (2010b). Modular branched neurotensin peptides for tumor target tracing and receptor-mediated therapy: a proof-of-concept. *Curr Cancer Drug Targets* 10, 695–704.
- Falisi, E., Novella, E., Visco, C., Guercini, N., Maura, F., Giaretta, I., Pomponi, F., Nichele, I., Finotto, S., Montaldi, A., et al. (2014). B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities. *Hematological Oncology* 32, 22–30.

- Fauchais, A.-L., Lalloue, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and Jauberteau, M.-O. (2008). Role of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor and Sortilin in B Cell Survival. *The Journal of Immunology* *181*, 3027–3038.
- Feifel, D., Goldenberg, J., Melendez, G., and Shilling, P.D. (2010). The acute and subchronic effects of a brain-penetrating, neurotensin-1 receptor agonist on feeding, body weight and temperature. *Neuropharmacology* *58*, 195–198.
- Ferrer, G., Bosch, R., Hodgson, K., Tejero, R., Roué, G., Colomer, D., Montserrat, E., and Moreno, C. (2014). B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *British Journal of Haematology* *164*, 570–578.
- Filip, A.A., Ciseł, B., Koczkodaj, D., Wąsik-Szczepanek, E., Piersiak, T., and Dmoszyńska, A. (2013). Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol. Dis.* *50*, 263–270.
- Filip, A.A., Ciseł, B., and Wąsik-Szczepanek, E. (2015). Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med* *15*, 73–83.
- Fiorcari, S., Maffei, R., Audrito, V., Martinelli, S., Hacken, E. ten, Zucchini, P., Grisendi, G., Potenza, L., Luppi, M., Burger, J.A., et al. (2016). Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* *7*, 65968–65981.
- Fischer, K., Cramer, P., Busch, R., Stilgenbauer, S., Bahlo, J., Schweighofer, C.D., Böttcher, S., Staib, P., Kiehl, M., Eckart, M.J., et al. (2011). Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3559–3566.
- Fischer, K., Bahlo, J., Fink, A.M., Goede, V., Herling, C.D., Cramer, P., Langerbeins, P., von Tresckow, J., Engelke, A., Maurer, C., et al. (2016). Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* *127*, 208–215.
- Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 554–567.
- Foon, K.A., and Gale, R.P. (1988). Clinical transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* *30*, 385–388.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 298–306.
- Furman, R.R., Sharman, J.P., Coutre, S.E., Cheson, B.D., Pagel, J.M., Hillmen, P., Barrientos, J.C., Zelenetz, A.D., Kipps, T.J., Flinn, I., et al. (2014). Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* *370*, 997–1007.
- Fuxe, K., Von Euler, G., Agnati, L.F., Merlo Pich, E., O'Connor, W.T., Tanganelli, S., Li, X.M., Tinner, B., Cintra, A., and Carani, C. (1992). Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *668*, 186–204.

- Gaidano, G., Foà, R., and Dalla-Favera, R. (2012). Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* *122*, 3432–3438.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* *14*, 1014–1022.
- Galustian, C., Meyer, B., Labarthe, M.-C., Dredge, K., Klaschka, D., Henry, J., Todryk, S., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., et al. (2009). The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *58*, 1033–1045.
- García-Garayoa, E., Bläuenstein, P., Blanc, A., Maes, V., Tourwé, D., and Schubiger, P.A. (2009). A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *36*, 37–47.
- García-Muñoz, R., Galiacho, V.R., and Llorente, L. (2012). Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann. Hematol.* *91*, 981–996.
- Garg, R., Wierda, W., Ferrajoli, A., Abruzzo, L., Pierce, S., Lerner, S., Keating, M., and O'Brien, S. (2012). The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* *118*, 3531–3537.
- Gaviglio, L., Gross, A., Metzler-Nolte, N., and Ravera, M. (2012). Synthesis and in vitro cytotoxicity of cis,cis,trans-diamminedichloridodisuccinatoplatinum(IV)-peptide bioconjugates. *Metallomics* *4*, 260–266.
- Gendron, L., Perron, A., Payet, M.D., Gallo-Payet, N., Sarret, P., and Beaudet, A. (2004). Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol. Pharmacol.* *66*, 1421–1430.
- van Gent, R., Kater, A.P., Otto, S.A., Jaspers, A., Borghans, J.A.M., Vrisekoop, N., Ackermans, M.A.T., Ruiter, A.F.C., Wittebol, S., Eldering, E., et al. (2008). In vivo dynamics of stable chronic lymphocytic leukemia inversely correlate with somatic hypermutation levels and suggest no major leukemic turnover in bone marrow. *Cancer Res.* *68*, 10137–10144.
- Gentile, M., Cutrona, G., Neri, A., Molica, S., Ferrarini, M., and Morabito, F. (2009). Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica* *94*, 887–888.
- Gesty-Palmer, D., Yuan, L., Martin, B., Wood, W.H., Lee, M.-H., Janech, M.G., Tsoi, L.C., Zheng, W.J., Luttrell, L.M., and Maudsley, S. (2013).  $\beta$ -arrestin-selective G protein-coupled receptor agonists engender unique biological efficacy in vivo. *Mol. Endocrinol.* *27*, 296–314.
- Ghamlouch, H., Nguyen-Khac, F., and Bernard, O.A. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era. *Br. J. Haematol.* *178*, 852–870.
- Ghia, P., Granziero, L., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. (2002a). Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* *12*, 149–155.
- Ghia, P., Strola, G., Granziero, L., Geuna, M., Guida, G., Sallusto, F., Ruffing, N., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., et al. (2002b). Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4<sup>+</sup>, CD40L<sup>+</sup> T cells by producing CCL22. *European Journal of Immunology* *32*, 1403–1413.
- Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C., and Caligaris-

- Cappio, F. (2003). The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* *101*, 1262–1269.
- Ghia, P., Circosta, P., Scielzo, C., Vallario, A., Camporeale, A., Granziero, L., and Caligaris-Cappio, F. (2005). Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *294*, 135–145.
- Ghia, P., Ferreri, A.M., and Caligaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *64*, 234–246.
- Ghosh, A.K., and Kay, N.E. (2013). Critical Signal Transduction Pathways in CLL. *Adv Exp Med Biol* *792*, 215–239.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 225–260.
- Giannoni, P., Scaglione, S., Quarto, R., Narcisi, R., Parodi, M., Balleari, E., Barbieri, F., Pattarozzi, A., Florio, T., Ferrini, S., et al. (2011). An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease. *Haematologica* *96*, 1015–1023.
- Giannoni, P., Pietra, G., Travaini, G., Quarto, R., Shyti, G., Benelli, R., Ottaggio, L., Mingari, M.C., Zupo, S., Cutrona, G., et al. (2014). Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* *99*, 1078–1087.
- Giraud, E., Inoue, M., and Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* *114*, 623–633.
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Carsetti, L., Berno, V., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2009). Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* *23*, 686–697.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C.M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dillhuydy, M.-S., Illmer, T., et al. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1101–1110.
- Gold, M.R., Scheid, M.P., Santos, L., Dang-Lawson, M., Roth, R.A., Matsuuchi, L., Duronio, V., and Krebs, D.L. (1999). The B Cell Antigen Receptor Activates the Akt (Protein Kinase B)/Glycogen Synthase Kinase-3 Signaling Pathway Via Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Immunology* *163*, 1894–1905.
- Goldin, L.R., Pfeiffer, R.M., Li, X., and 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.
- Gonzalez, D., Martinez, P., Wade, R., Hockley, S., Oscier, D., Matutes, E., Dearden, C.E., Richards, S.M., Catovsky, D., and Morgan, G.J. (2011). Mutational Status of the TP53 Gene As a Predictor of Response and Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: Results From the LRF CLL4 Trial. *JCO* *29*, 2223–2229.

- Goodnow, C.C., Sprent, J., Groth, B.F. de S., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity.
- Gordon, S., and Mantovani, A. (2011). Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2470–2472.
- de Gorter, D.J.J., Beuling, E.A., Kersseboom, R., Middendorp, S., van Gils, J.M., Hendriks, R.W., Pals, S.T., and Spaargaren, M. (2007). Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* *26*, 93–104.
- Gottardi, D., Alfarano, A., De Leo, A.M., Stacchini, A., Aragno, M., Rigo, A., Veneri, D., Zanotti, R., Pizzolo, G., and 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.
- Granziero, L., Circosta, P., Scielzo, C., Frisaldi, E., Stella, S., Geuna, M., Giordano, S., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2003). CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood* *101*, 1962–1969.
- Greaves, M. (2013). Clonal expansion in B-CLL: Fungal drivers or self-service? *Journal of Experimental Medicine* *210*, 1–3.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883–899.
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R.M., Tam, C., Loda, M., and Rollins, B.J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* *404*, 407–411.
- Guarini, A., Chiaretti, S., Tavolaro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Ricciardi, M.R., Santangelo, S., Marinelli, M., Propriis, M.S.D., et al. (2008). BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgVH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* *112*, 782–792.
- Guarini, A., Marinelli, M., Tavolaro, S., Bellacchio, E., Magliozzi, M., Chiaretti, S., De Propriis, M.S., Peragine, N., Santangelo, S., Paoloni, F., et al. (2012). ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* *97*, 47–55.
- Guha, S., Rey, O., and Rozengurt, E. (2002). Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res.* *62*, 1632–1640.
- Guha, S., Lunn, J.A., Santiskulvong, C., and Rozengurt, E. (2003). Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res.* *63*, 2379–2387.
- Gui, X., Guzman, G., Dobner, P.R., and Kadkol, S.S. (2008). Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides* *29*, 1609–1615.
- Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J.C., Poncelet, M., Gueudet, C., Heulme, M., Leyris, R., and Brouard, A. (1993). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 65–69.
- Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, A., Poncelet, M., Steinberg,

- R., Suaud-Chagny, M.F., Santucci, V., Vita, N., et al. (1997). Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *280*, 802–812.
- Gunn, M.D., Ngo, V.N., Ansel, K.M., Ekland, E.H., Cyster, J.G., and Williams, L.T. (1998). A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* *391*, 799–803.
- Guruvayoorappan, C. (2008). Tumor Versus Tumor-Associated Macrophages: How Hot is the Link? *Integr Cancer Ther* *7*, 90–95.
- Haase, C., Bergmann, R., Oswald, J., Zips, D., and Pietzsch, J. (2006). Neurotensin Receptors in Adeno- and Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* *26*, 3527–3533.
- Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W., and Haferlach, T. (2007). Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV<sub>H</sub> status and immunophenotyping. *Leukemia* *21*, 2442–2451.
- Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N.F., Plüddemann, A., Charles, K., Gordon, S., and Balkwill, F.R. (2006). Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J. Immunol.* *176*, 5023–5032.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* *6*, 845–858.
- Hallek, M. (2015). Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* *90*, 446–460.
- Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment: HALLEK. *American Journal of Hematology* *92*, 946–965.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., et al. (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *93*, 1732–1737.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R., et al. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* *111*, 5446–5456.
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A.M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., et al. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* *376*, 1164–1174.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., et al. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* *131*, 2745–2760.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated

Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848–1854.

Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Thomas, P.W., Stevenson, F.K., and Oscier, D.G. (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99, 1023–1029.

Hammer, R.A., Carraway, R.E., and Leeman, S.E. (1982). Elevation of Plasma Neurotensinlike Immunoreactivity after a Meal. *J Clin Invest* 70, 74–81.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J.C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820–1828.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hantzopoulos, P.A., Suri, C., Glass, D.J., Goldfarb, M.P., and Yancopoulos, G.D. (1994). The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 13, 187–201.

Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., and Yang, S.-M. (2012). Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin Dev Immunol* 2012.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol.* 17, 3835–3849.

Hartley, G.P., Chow, L., Ammons, D.T., Wheat, W.H., and Dow, S.W. (2018). Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. *Cancer Immunol Res.*

Hashimoto, A., Okada, H., Jiang, A., Kurosaki, M., Greenberg, S., Clark, E.A., and Kurosaki, T. (1998). Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 188, 1287–1295.

Hassan, S., Dobner, P.R., and Carraway, R.E. (2004). Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells. *Regul. Pept.* 120, 155–166.

Hayes, G.M., Busch, R., Voogt, J., Siah, I.M., Gee, T.A., Hellerstein, M.K., Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Murphy, E.J. (2010). Isolation of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) for analysis of cell proliferation: validation of a simplified method suitable for multi-center clinical studies. *Leuk. Res.* 34, 809–815.

He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E.J., Knowles, D.M., and Cerutti, A. (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and

APRIL. *J. Immunol.* 172, 3268–3279.

Heinen, T.E., Dos Santos, R.P., da Rocha, A., Dos Santos, M.P., Lopez, P.L. da C., Silva Filho, M.A., Souza, B.K., Rivero, L.F. da R., Becker, R.G., Gregianin, L.J., et al. (2016). Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 7, 34860–34880.

Heinig, K., Gätjen, M., Grau, M., Stache, V., Anagnostopoulos, I., Gerlach, K., Niesner, R.A., Cseresnyes, Z., Hauser, A.E., Lenz, P., et al. (2014). Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov* 4, 1448–1465.

Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678–683.

Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., et al. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117, 563–574.

Herndon, T.M., Chen, S.-S., Saba, N.S., Valdez, J., Emson, C., Gattmaitan, M., Tian, X., Hughes, T.E., Sun, C., Arthur, D.C., et al. (2017). Direct in vivo Evidence for Increased Proliferation of CLL Cells in Lymph Nodes Compared to Bone Marrow and Peripheral Blood. *Leukemia* 31, 1340–1347.

Herrup, K., and Shooter, E.M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3884–3888.

Hewamana, S., Alghazal, S., Lin, T.T., Clement, M., Jenkins, C., Guzman, M.L., Jordan, C.T., Neelakantan, S., Crooks, P.A., Burnett, A.K., et al. (2008). The NF- $\kappa$ B subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 111, 4681–4689.

Hillis, J., O'Dwyer, M., and Gorman, A.M. (2016). Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 41–56.

Hillmen, P., Robak, T., Janssens, A., Babu, K.G., Kloczko, J., Grosicki, S., Doubek, M., Panagiotidis, P., Kimby, E., Schuh, A., et al. (2015). Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet* 385, 1873–1883.

Hoellenriegel, J., Meadows, S.A., Sivina, M., Wierda, W.G., Kantarjian, H., Keating, M.J., Giese, N., O'Brien, S., Yu, A., Miller, L.L., et al. (2011). The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118, 3603–3612.

Hoellenriegel, J., Coffey, G.P., Sinha, U., Pandey, A., Sivina, M., Ferrajoli, A., Ravandi, F., Wierda, W.G., O'Brien, S., Keating, M.J., et al. (2012). Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia* 26, 1576–1583.

Hoellenriegel, J., Zboralski, D., Maasch, C., Rosin, N.Y., Wierda, W.G., Keating, M.J.,



- Kruschinski, A., and Burger, J.A. (2014). The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* *123*, 1032–1039.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emlet, D.R., Dieterich, R., and Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 12419–12424.
- Holst, B., Holliday, N.D., Bach, A., Elling, C.E., Cox, H.M., and Schwartz, T.W. (2004). Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J. Biol. Chem.* *279*, 53806–53817.
- Hoogeboom, R., Wormhoudt, T.A., Schipperus, M.R., Langerak, A.W., Dunn-Walters, D.K., Guikema, J.E.J., Bende, R.J., and Noesel, C.J.M. van (2013). A novel chronic lymphocytic leukemia subset expressing mutated IGHV3-7-encoded rheumatoid factor B-cell receptors that are functionally proficient. *Leukemia* *27*, 738–740.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 609–642.
- Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., McCarty, M., Wu, W., Langley, R., and Fidler, I.J. (2002). Contributions of Stromal Metalloproteinase-9 to Angiogenesis and Growth of Human Ovarian Carcinoma in Mice. *J Natl Cancer Inst* *94*, 1134–1142.
- Hughes, R., Qian, B.-Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O.C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., et al. (2015). Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res.* *75*, 3479–3491.
- Hui, L., and Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters* *368*, 7–13.
- Hussain, S.-R.A., Cheney, C.M., Johnson, A.J., Lin, T.S., Grever, M.R., Caligiuri, M.A., Lucas, D.M., and Byrd, J.C. (2007). Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2144–2150.
- Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., O'Brien, S., Huh, Y.O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H.M., and Albitar, M. (2001). CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *98*, 181–186.
- Iguchi, A., Matsunaga, H., Nomura, T., Gotoh, M., and Sakamoto, N. (1984). Glucoregulatory effects of intrahypothalamic injections of bombesin and other peptides. *Endocrinology* *114*, 2242–2246.
- Ito, M., Minamiya, Y., Kawai, H., Saito, S., Saito, H., Nakagawa, T., Imai, K., Hirokawa, M., and Ogawa, J. (2006). Tumor-Derived TGFβ-1 Induces Dendritic Cell Apoptosis in the Sentinel Lymph Node. *The Journal of Immunology* *176*, 5637–5643.
- Iyer, R., Evans, A.E., Qi, X., Ho, R., Minturn, J.E., Zhao, H., Balamuth, N., Maris, J.M., and Brodeur, G.M. (2010). Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* *16*, 1478–1485.
- Iyer, R., Varela, C.R., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Light, J.E., Evans, A.E., Zhao, H., Thress, K., Brown, J.L., et al. (2012). AZ64 inhibits TrkB and enhances the efficacy of

chemotherapy and local radiation in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *70*, 477–486.

Jaglowski, S.M., Ruppert, A.S., Heerema, N.A., Bingman, A., Flynn, J.M., Grever, M.R., Jones, J.A., Elder, P., Devine, S.M., Byrd, J.C., et al. (2012). Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* *159*, 82–87.

Jain, N., Thompson, P.A., Burger, J.A., Borthakur, G., Bose, P., Estrov, Z., Ferrajoli, A., Gandhi, V., Plunkett, W., Lopez, W., et al. (2017a). Ibrutinib, fludarabine, cyclophosphamide, and obinutuzumab (GA101) (iFCG) for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) with mutated IGHV and non-del (17p). *JCO* *35*, 7522–7522.

Jain, N., Thompson, P.A., Ferrajoli, A., Burger, J.A., Borthakur, G., Takahashi, K., Bose, P., Estrov, Z., Jabbour, E.J., Konopleva, M., et al. (2017b). Combined Venetoclax and Ibrutinib for Patients with Previously Untreated High-Risk CLL, and Relapsed/Refractory CLL: A Phase II Trial. *Blood* *130*, 429–429.

Jain, P., Noguera González, G.M., Kanagal-Shamanna, R., Rozovski, U., Sarwari, N., Tam, C., Wierda, W.G., Thompson, P.A., Jain, N., Luthra, R., et al. (2018). The absolute percent deviation of IGHV mutation rather than a 98% cut-off predicts survival of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *Br. J. Haematol.* *180*, 33–40.

James, D.F., Werner, L., Brown, J.R., Wierda, W.G., Barrientos, J.C., Castro, J.E., Greaves, A., Johnson, A.J., Rassenti, L.Z., Rai, K.R., et al. (2014). Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium. *J. Clin. Oncol.* *32*, 2067–2073.

Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J.R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S.S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* *10*, 1449–1457.

Jeanneteau, F., Garabedian, M.J., and Chao, M.V. (2008). Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 4862–4867.

Ji, R.-C. (2006). Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 677–694.

Jia, L., Clear, A., Liu, F.-T., Matthews, J., Uddin, N., McCarthy, A., Hoxha, E., Durance, C., Iqbal, S., and Gribben, J.G. (2014). Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *123*, 1709–1719.

Jitschin, R., Braun, M., Büttner, M., Dettmer-Wilde, K., Bricks, J., Berger, J., Eckart, M.J., Krause, S.W., Oefner, P.J., Le Blanc, K., et al. (2014). CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* *124*, 750–760.

Jitschin, R., Braun, M., Qorraj, M., Saul, D., Le Blanc, K., Zenz, T., and Mougiakakos, D. (2015). Stromal cell-mediated glycolytic switch in CLL cells involves Notch-c-Myc signaling. *Blood* *125*, 3432–3436.

- Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912.
- Jones, J.A., Robak, T., Brown, J.R., Awan, F.T., Badoux, X., Coutre, S., Loscertales, J., Taylor, K., Vandenberghe, E., Wach, M., et al. (2017). Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol* 4, e114–e126.
- Jones, J.A., Mato, A.R., Wierda, W.G., Davids, M.S., Choi, M., Cheson, B.D., Furman, R.R., Lamanna, N., Barr, P.M., Zhou, L., et al. (2018). Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 19, 65–75.
- Joo, E.-K., Broxmeyer, H.E., Kwon, H.-J., Kang, H.B., Sook Kim, J., Seok Lim, J., Choe, Y.-K., Choe, I.S., Myung, P.K., and Lee, Y. (2004). Enhancement of Cell Survival by Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCL12 Involves Activation of CREB and Induction of Mcl-1 and c-Fos in Factor-Dependent Human Cell Line MO7e. *Stem Cells and Development* 13, 563–570.
- Josephs, D.H., Bax, H.J., and Karagiannis, S.N. (2015). Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)* 7, 293–308.
- Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354.
- Kaaks, R., Sookthai, D., Łuczyńska, A., Oakes, C.C., Becker, S., Johnson, T., Johansson, A., Melin, B., Sjöberg, K., Trichopoulos, D., et al. (2015). Lag times between lymphoproliferative disorder and clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective analysis using plasma soluble CD23. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 538–545.
- Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W., and Landreth, G.E. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18169–18177.
- Karp, M., and Giannopoulos, K. (2013). Antigen stimulation in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67, 1204–1213.
- Kashyap, M.K., Kumar, D., Jones, H., Amaya-Chanaga, C.I., Choi, M.Y., Melo-Cardenas, J., Ale-Ali, A., Kuhne, M.R., Sabbatini, P., Cohen, L.J., et al. (2016). Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget* 7, 2809–2822.
- Katrinakis, G., Kyriakou, D., Papadaki, H., Kalokyri, I., Markidou, F., and Eliopoulos, G.D. (1996). Defective Natural Killer Cell Activity in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia Is Associated with Impaired Release of Natural Killer Cytotoxic Factor(s) but Not of Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ . *AHA* 96, 16–23.
- Kay, N.E., and Zarlind, J.M. (1984). Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood* 63, 305–309.
- Kay, N.E., O'Brien, S.M., Pettitt, A.R., and Stilgenbauer, S. (2007). The role of prognostic factors in assessing “high-risk” subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia.

Leukemia 21, 1885–1891.

Keating, M.J., O'Brien, S., Lerner, S., Koller, C., Beran, M., Robertson, L.E., Freireich, E.J., Estey, E., and Kantarjian, H. (1998). Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 92, 1165–1171.

Keating, M.J., O'Brien, S., Albitar, M., Lerner, S., Plunkett, W., Giles, F., Andreeff, M., Cortes, J., Faderl, S., Thomas, D., et al. (2005). Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23, 4079–4088.

Kern, C., Cornuel, J.-F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.-Y., Feldblum, S., et al. (2004). Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 103, 679–688.

Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.L., Bartke, I., et al. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865–870.

Khursigara, G., Orlinick, J.R., and Chao, M.V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* 274, 2597–2600.

Khursigara, G., Bertin, J., Yano, H., Moffett, H., DiStefano, P.S., and Chao, M.V. (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J. Neurosci.* 21, 5854–5863.

Kikushige, Y., and Miyamoto, T. (2014). Hematopoietic stem cell aging and chronic lymphocytic leukemia pathogenesis. *Int. J. Hematol.* 100, 335–340.

Kikushige, Y., and Miyamoto, T. (2015). Pre-malignant lymphoid cells arise from hematopoietic stem/progenitor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol* 102, 528–535.

Kikushige, Y., Ishikawa, F., Miyamoto, T., Shima, T., Urata, S., Yoshimoto, G., Mori, Y., Iino, T., Yamauchi, T., Eto, T., et al. (2011). Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20, 246–259.

Kim, J.T., Li, J., Song, J., Lee, E.Y., Weiss, H.L., Townsend, C.M., and Evers, B.M. (2015). Differential expression and tumorigenic function of neurotensin receptor 1 in neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget* 6, 26960–26970.

Kim, J.T., Weiss, H.L., and Evers, B.M. (2017). Diverse expression patterns and tumorigenic role of neurotensin signaling components in colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.* 50, 2200–2206.

Kim, J.T., Napier, D.L., Weiss, H.L., Lee, E.Y., Townsend, C.M., and Evers, B.M. (2018). Neurotensin Receptor 3/Sortilin Contributes to Tumorigenesis of Neuroendocrine Tumors Through Augmentation of Cell Adhesion and Migration. *Neoplasia* 20, 175–181.

- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Kusunoki, T., Hosoi, S., and Mikawa, H. (1991). Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur. J. Immunol.* *21*, 137–141.
- Kingsbury, T.J., and Krueger, B.K. (2007). Ca<sup>2+</sup>, CREB and krüppel: a novel KLF7-binding element conserved in mouse and human TRKB promoters is required for CREB-dependent transcription. *Mol. Cell. Neurosci.* *35*, 447–455.
- Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O’Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 17008.
- Kislauskis, E., Bullock, B., McNeil, S., and Dobner, P.R. (1988). The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J. Biol. Chem.* *263*, 4963–4968.
- Kitabgi, P. (2006). Differential processing of pro-neurotensin/neuromedin N and relationship to pro-hormone convertases. *Peptides* *27*, 2508–2514.
- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., et al. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* *91*, 3379–3389.
- Kleczkowska, P., and Lipkowski, A.W. (2013). Neurotensin and neurotensin receptors: Characteristic, structure–activity relationship and pain modulation—A review. *European Journal of Pharmacology* *716*, 54–60.
- Klein, G. (1994). Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell* *77*, 791–793.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O’Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* *65*, 189–197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991b). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* *66*, 395–403.
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., et al. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* *17*, 28–40.
- Koon, H.-W., Kim, Y.S., Xu, H., Kumar, A., Zhao, D., Karagiannides, I., Dobner, P.R., and Pothoulakis, C. (2009). Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 8766–8771.
- Kostareli, E., Gounari, M., Janus, A., Murray, F., Brochet, X., Giudicelli, V., Pospisilova, S., Oscier, D., Foroni, L., Celle, P.F. di, et al. (2012). Antigen receptor stereotypy across B-cell lymphoproliferations: the case of IGHV4-59/IGKV3-20 receptors with rheumatoid factor activity. *Leukemia* *26*, 1127–1131.
- Kraemer, B.R., Snow, J., Vollbrecht, P., Pathak, A., Valentine, W.M., Deutch, A.Y., and Carter, B.D. (2014). A role for the p75 neurotrophin receptor in axonal degeneration and

apoptosis induced by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 21205–21216.

Krajewska, M., Krajewski, S., Zapata, J.M., Van Arsdale, T., Gascoyne, R.D., Berern, K., McFadden, D., Shabaik, A., Hugh, J., Reynolds, A., et al. (1998). TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am. J. Pathol.* 152, 1549–1561.

Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117, 787–800.

Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., Döhner, H., and Stilgenbauer, S. (2002). V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 1410–1416.

Kröber, A., Bloehdorn, J., Hafner, S., Bühler, A., Seiler, T., Kienle, D., Winkler, D., Bangerter, M., Schlenk, R.F., Benner, A., et al. (2006). Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 24, 969–975.

Kruk, J.S., Vasefi, M.S., Heikkila, J.J., and Beazely, M.A. (2013a). Reactive oxygen species are required for 5-HT-induced transactivation of neuronal platelet-derived growth factor and TrkB receptors, but not for ERK1/2 activation. *PLoS ONE* 8, e77027.

Kruk, J.S., Vasefi, M.S., Liu, H., Heikkila, J.J., and Beazely, M.A. (2013b). 5-HT(1A) receptors transactivate the platelet-derived growth factor receptor type beta in neuronal cells. *Cell Signal* 25, 133–143.

Krzysiek, R., Lefèvre, E.A., Zou, W., Foussat, A., Bernard, J., Portier, A., Galanaud, P., and Richard, Y. (1999). Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells. *J. Immunol.* 162, 4455–4463.

Kubota, K., Moriyama, M., Furukawa, S., Rafiul, H.A.S.M., Maruse, Y., Jinno, T., Tanaka, A., Ohta, M., Ishiguro, N., Yamauchi, M., et al. (2017). CD163 + CD204 + tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 7, 1755.

Kurosaki, T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 354–363.

Labouyrie, E., Parrens, M., de Mascarel, A., Bloch, B., and Merlio, J.P. (1997). Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *J. Neuroimmunol.* 77, 161–173.

Labouyrie, E., Dubus, P., Groppi, A., Mahon, F.X., Ferrer, J., Parrens, M., Reiffers, J., de Mascarel, A., and Merlio, J.P. (1999). Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am. J. Pathol.* 154, 405–415.

Lad, D.P., Varma, S., Varma, N., Sachdeva, M.U.S., Bose, P., and Malhotra, P. (2015). Regulatory T-cell and T-helper 17 balance in chronic lymphocytic leukemia progression and autoimmune cytopenias. *Leuk. Lymphoma* 56, 2424–2428.

- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., and 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.
- Lam, K.P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* *90*, 1073–1083.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* *66*, 967–979.
- Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Bonini, S., Starace, G., D'Elisio, M.M., De Carli, M., and Aloe, L. (1997). Human CD4<sup>+</sup> T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* *100*, 408–414.
- Lanasa, M.C. (2010). Novel insights into the biology of CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* *2010*, 70–76.
- Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., et al. (2013). Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell* *152*, 714–726.
- Landau, D.A., Sun, C., Rosebrock, D., Herman, S.E.M., Fein, J., Sivina, M., Underbayev, C., Liu, D., Hoellenriegel, J., Ravichandran, S., et al. (2017). The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. *Nature Communications* *8*, 2185.
- Lange, A.M., and Lo, H.-W. (2018). Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* *10*.
- Lannutti, B.J., Meadows, S.A., Herman, S.E.M., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A.J., Byrd, J.C., Tyner, J.W., Loriaux, M.M., Deininger, M., et al. (2011). CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* *117*, 591–594.
- Laurent, P., Clerc, P., Mattei, M.G., Forgez, P., Dumont, X., Ferrara, P., Caput, D., and Rostene, W. (1994). Chromosomal localization of mouse and human neurotensin receptor genes. *Mamm. Genome* *5*, 303–306.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* *112*, 1570–1580.
- Lee, F.S., and Chao, M.V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 3555–3560.
- Lee, B.-N., Gao, H., Cohen, E.N., Badoux, X., Wierda, W.G., Estrov, Z., Faderl, S.H., Keating, M.J., Ferrajoli, A., and Reuben, J.M. (2011). Treatment with lenalidomide modulates T-cell immunophenotype and cytokine production in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* *117*, 3999–4008.
- Lee, F.S., Rajagopal, R., Kim, A.H., Chang, P.C., and Chao, M.V. (2002). Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J. Biol. Chem.* *277*, 9096–9102.
- Lee, J.S., Dixon, D.O., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., and Talpaz, M. (1987). Prognosis of

- chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 69, 929–936.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Leserer, M., Gschwind, A., and Ullrich, A. (2000). Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life* 49, 405–409.
- Lessmann, V., and Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci. Res.* 65, 11–22.
- Lessmann, V., Gottmann, K., and Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.
- Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res* 66, 605–612.
- Li, J., Song, J., Zaytseva, Y.Y., Liu, Y., Rychahou, P., Jiang, K., Starr, M.E., Kim, J.T., Harris, J.W., Yiannikouris, F.B., et al. (2016). An obligatory role for neurotensin in high-fat-diet-induced obesity. *Nature* 533, 411–415.
- Li, Z., Beutel, G., Rhein, M., Meyer, J., Koenecke, C., Neumann, T., Yang, M., Krauter, J., von Neuhoff, N., Heuser, M., et al. (2009). High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* 113, 2028–2037.
- Li, Z., Zhang, Y., Tong, Y., Tong, J., and Thiele, C.J. (2015). Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 16, 477–483.
- Lipsky, R.H., Xu, K., Zhu, D., Kelly, C., Terhakopian, A., Novelli, A., and Marini, A.M. (2001). Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J. Neurochem.* 78, 254–264.
- Liu, Q., and Wang, H.-G. (2012). Anti-cancer drug discovery and development: Bcl-2 family small molecule inhibitors. *Commun Integr Biol* 5, 557–565.
- Liu, J., Agopiantz, M., Poupon, J., Wu, Z., Just, P.-A., Borghese, B., Ségal-Bendirdjian, E., Gauchotte, G., Gompel, A., and Forgez, P. (2017). Neurotensin receptor 1 antagonist SR48692 improves response to carboplatin by enhancing apoptosis and inhibiting drug efflux in ovarian cancer. *Clin Cancer Res clincanres.0861.2017*.
- Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Petlickovski, A., Pelosi, M., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2007). The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 21, 110–120.
- Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111, 846–855.
- López-Fraga, M., Fernández, R., Albar, J.P., and Hahne, M. (2001). Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep.* 2, 945–951.



- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196, 395–406.
- Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A.J., Dürig, J., Wagner, M., Haferlach, C., Kohlmann, A., et al. (2013). Protein Kinase C- $\beta$ -Dependent Activation of NF- $\kappa$ B in Stromal Cells Is Indispensable for the Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells In Vivo. *Cancer Cell* 23, 77–92.
- Ma, D., Chen, Z., Patel, K.P., Mishra, B.M., Yao, H., Abruzzo, L.V., Medeiros, L.J., Wierda, W., Keating, M., Sargent, R., et al. (2011). Array comparative genomic hybridization analysis identifies recurrent gain of chromosome 2p25.3 involving the ACP1 and MYCN genes in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11 Suppl 1, S17-24.
- Ma, S., Brander, D.M., Seymour, J.F., Kipps, T.J., Barrientos, J.C., Davids, M.S., Anderson, M.A., Choi, M.Y., Tam, C.S., Mason-Bright, T., et al. (2015). Deep and Durable Responses Following Venetoclax (ABT-199 / GDC-0199) Combined with Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from a Phase 1b Study. *Blood* 126, 830–830.
- MacFarlane, A.W., Jillab, M., Smith, M.R., Alpaugh, R.K., Cole, M.E., Litwin, S., Millenson, M.M., Al-Saleem, T., Cohen, A.D., and Campbell, K.S. (2017). NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology* 6.
- Mackay, F., and Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 491–502.
- Maddocks, K.J., Ruppert, A.S., Lozanski, G., Heerema, N.A., Zhao, W., Abruzzo, L., Lozanski, A., Davis, M., Gordon, A., Smith, L.L., et al. (2015). Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol* 1, 80–87.
- Maeno, H., Yamada, K., Santo-Yamada, Y., Aoki, K., Sun, Y.-J., Sato, E., Fukushima, T., Ogura, H., Araki, T., Kamichi, S., et al. (2004). Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res.* 998, 122–129.
- Maffei, R., Fiorcari, S., Bulgarelli, J., Martinelli, S., Castelli, I., Deaglio, S., Debbia, G., Fontana, M., Coluccio, V., Bonacorsi, G., et al. (2012). Physical contact with endothelial cells through  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica* 97, 952–960.
- Maffei, R., Bulgarelli, J., Fiorcari, S., Martinelli, S., Castelli, I., Valenti, V., Rossi, D., Bonacorsi, G., Zucchini, P., Potenza, L., et al. (2014). Endothelin-1 promotes survival and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia B cells through ETA receptor. *PLoS ONE* 9, e98818.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501–509.
- Maki, G., Hayes, G.M., Najj, A., Tyler, T., Carosella, E.D., Rouas-Freiss, N., and Gregory, S.A. (2008). NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic

leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia* 22, 998–1006.

Malavasi, F., Deaglio, S., Damle, R., Cutrona, G., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2011). CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 118, 3470–3478.

Malcikova, J., Smardova, J., Rocnova, L., Tichy, B., Kuglik, P., Vranova, V., Cejkova, S., Svitakova, M., Skuhrova Francova, H., Brychtova, Y., et al. (2009). Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 114, 5307–5314.

Mantovani, A., and Locati, M. (2013). Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1478–1483.

Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology* 22, 231–237.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.

Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14, 399–416.

Maoret, J.J., Anini, Y., Rouyer-Fessard, C., Gully, D., and Laburthe, M. (1999). Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int. J. Cancer* 80, 448–454.

Marasca, R., Maffei, R., Martinelli, S., Fiorcari, S., Bulgarelli, J., Debbia, G., Rossi, D., Rossi, F.M., Rigolin, G.M., Martinelli, S., et al. (2013). Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematological Oncology* 31, 88–95.

Marini, A.M., Jiang, X., Wu, X., Tian, F., Zhu, D., Okagaki, P., and Lipsky, R.H. (2004). Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor. Neurol. Neurosci.* 22, 121–130.

Marondel, I., Renault, B., Lieman, J., Ward, D., and Kucherlapati, R. (1996). Physical mapping of the human neurotensin gene (NTS) between markers D12S1444 and D12S81 on chromosome 12q21. *Genomics* 38, 243–245.

Marquez, M.-E., Hernández-Uzcátegui, O., Cornejo, A., Vargas, P., and Da Costa, O. (2015). Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL. *Br. J. Haematol.* 169, 211–218.

Martin, S., Navarro, V., Vincent, J.P., and Mazella, J. (2002). Neurotensin receptor–1 and –3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123, 1135–1143.

Martin, S., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2003). Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J. Neurosci.* 23, 1198–1205.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6.

- Martínez-Trillos, A., Pinyol, M., Navarro, A., Aymerich, M., Jares, P., Juan, M., Rozman, M., Colomer, D., Delgado, J., Giné, E., et al. (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* *123*, 3790–3796.
- Maruyama, I., and Maruyama, I.N. (2014). Mechanisms of Activation of Receptor Tyrosine Kinases: Monomers or Dimers. *Cells* *3*, 304–330.
- Massa, F., Devader, C., Lacas-Gervais, S., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2014). Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes Cancer* *5*, 240–249.
- Mato, A.R., Hill, B.T., Lamanna, N., Barr, P.M., Ujjani, C.S., Brander, D.M., Howlett, C., Skarbnik, A.P., Cheson, B.D., Zent, C.S., et al. (2017). Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: results from a multicenter study of 683 patients. *Ann. Oncol.* *28*, 1050–1056.
- Matsuda, Y., Haneda, M., Kadomatsu, K., and Kobayashi, T. (2015). A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27<sup>-</sup>) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cellular Immunology* *295*, 127–136.
- Matthews, C., Catherwood, M.A., Morris, T.C.M., Kettle, P.J., Drake, M.B., Gilmore, W.S., and Alexander, H.D. (2006). Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur. J. Haematol.* *77*, 309–317.
- Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T.H., and Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* *8*, 1640–1645.
- Mauro, F.R., Giammartini, E., Gentile, M., Sperduti, I., Valle, V., Pizzuti, A., Guarini, A., Giannarelli, D., and Foà, R. (2006). Clinical features and outcome of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *91*, 1117–1120.
- Mazella, J., and Vincent, J.-P. (2006). Internalization and recycling properties of neurotensin receptors. *Peptides* *27*, 2488–2492.
- Mazella, J., Botto, J.M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., and Vincent, J.P. (1996). Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.* *16*, 5613–5620.
- McClanahan, F., Hanna, B., Miller, S., Clear, A.J., Lichter, P., Gribben, J.G., and Seiffert, M. (2015). PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *126*, 203–211.
- Meldolesi, J. (2018). Neurotrophin Trk Receptors: New Targets for Cancer Therapy. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *174*, 67–79.
- Menguy, S., Prochazkova-Carlotti, M., Beylot-Barry, M., Saltel, F., Vergier, B., Merlio, J.-P., and Pham-Ledard, A. (2018). PD-L1 and PD-L2 Are Differentially Expressed by Macrophages or Tumor Cells in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *Am. J. Surg. Pathol.* *42*, 326–334.

- Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., et al. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* *115*, 755–764.
- Michels, J., O’Neill, J.W., Dallman, C.L., Mouzakiti, A., Habens, F., Brimmell, M., Zhang, K.Y.J., Craig, R.W., Marcusson, E.G., Johnson, P.W.M., et al. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* *23*, 4818–4827.
- Mignini, F., Sabbatini, M., D’Andrea, V., and Cavallotti, C. (2011). Neuropeptides of human thymus in normal and pathological conditions. *Peptides* *32*, 920–928.
- Mijatovic, T., Gailly, P., Mathieu, V., De Nève, N., Yeaton, P., Kiss, R., and Decaestecker, C. (2007). Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Cell. Oncol.* *29*, 315–326.
- Mills, C.D., and Ley, K. (2014). M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *J Innate Immun* *6*, 716–726.
- Mira, E., Carmona-Rodríguez, L., Tardáguila, M., Azcoitia, I., González-Martín, A., Almonacid, L., Casas, J., Fabriás, G., and Mañes, S. (2013). A lovastatin-elicited genetic program inhibits M2 macrophage polarization and enhances T cell infiltration into spontaneous mouse mammary tumors. *Oncotarget* *4*, 2288–2301.
- Mitchem, J.B., Brennan, D.J., Knolhoff, B.L., Belt, B.A., Zhu, Y., Sanford, D.E., Belaygorod, L., Carpenter, D., Collins, L., Piwnica-Worms, D., et al. (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* *73*, 1128–1141.
- Mitra, S.P. (2017). Neurotensin and Neurotensin Receptors in health and diseases: A brief review. *INDIAN J. BIOCHEM. BIOPHYS.* *54*, 17.
- Mitre, M., Mariga, A., and Chao, M.V. (2017). Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci.* *131*, 13–23.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293–299.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* *9*, 1799–1805.
- Miyata, Y., Ohba, K., Kanda, S., Nomata, K., Eguchi, J., Hayashi, T., and Kanetake, H. (2006). Pathological function of prostaglandin E2 receptors in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* *448*, 822–829.
- Mohammad, I.S., Zhuang, J., Pettitt, A., Oates, M., and Lin, K. (2017). Use of differentiated THP. 1 cells to mimic nurse-like cells for its pro-survival effect on chronic lymphocytic leukaemia cells. In *LEUKEMIA & LYMPHOMA*, pp. 102–104.
- Mohr, A., Renaudineau, Y., Bagacean, C., Pers, J.-O., Jamin, C., and Bordron, A. (2016). Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* *5*.

- Molica, S. (1994). Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk. Lymphoma* *13*, 203–214.
- Molica, S., Levato, D., Dell’Olio, M., Matera, R., Minervini, M., Dattilo, A., Carotenuto, M., and Musto, P. (1996). Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Haematologica* *81*, 428–433.
- Montillo, M., Hamblin, T., Hallek, M., Montserrat, E., and Morra, E. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* *90*, 391–399.
- Montserrat, E. (2006). New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 279–284.
- Moodie, S.A., and Wolfman, A. (1994). The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends in Genetics* *10*, 44–48.
- Moody, T.W., Chiles, J., Casibang, M., Moody, E., Chan, D., and Davis, T.P. (2001). SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides* *22*, 109–115.
- Moody, T.W., Chan, D.C., Mantey, S.A., Moreno, P., and Jensen, R.T. (2014). SR48692 inhibits non-small cell lung cancer proliferation in an EGF receptor-dependent manner. *Life Sci.* *100*, 25–34.
- Moody, T.W., Nuche-Berenguer, B., Nakamura, T., and Jensen, R.T. (2016). EGFR Transactivation by Peptide G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Curr Drug Targets* *17*, 520–528.
- Moore, R.N., Osmand, A.P., Dunn, J.A., Joshi, J.G., Koontz, J.W., and Rouse, B.T. (1989). Neurotensin regulation of macrophage colony-stimulating factor-stimulated in vitro myelopoiesis. *J. Immunol.* *142*, 2689–2694.
- Morabito, F., Mosca, L., Cutrona, G., Agnelli, L., Tuana, G., Ferracin, M., Zagatti, B., Lionetti, M., Fabris, S., Maura, F., et al. (2013). Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clin. Cancer Res.* *19*, 5890–5900.
- Moreau, E.J., Matutes, E., A’Hern, R.P., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Seon, B.K., and Catovsky, D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.* *108*, 378–382.
- Morilla, A., Gonzalez de Castro, D., Del Giudice, I., Osuji, N., Else, M., Morilla, R., Brito Babapulle, V., Rudenko, H., Matutes, E., Dearden, C., et al. (2008). Combinations of ZAP-70, CD38 and IGHV mutational status as predictors of time to first treatment in CLL. *Leukemia & Lymphoma* *49*, 2108–2115.
- Morotti, A., Mila, S., Accornero, P., Tagliabue, E., and Ponzetto, C. (2002). K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* *21*, 4885–4893.
- Morrison, V.A. (2010). Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol* *23*, 145–153.

- Motta, M., Rassenti, L., Shelvin, B.J., Lerner, S., Kipps, T.J., Keating, M.J., and Wierda, W.G. (2005). Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *19*, 1788–1793.
- Moura, L.I.F., Silva, L., Leal, E.C., Tellechea, A., Cruz, M.T., and Carvalho, E. (2013). Neurotensin Modulates the Migratory and Inflammatory Response of Macrophages under Hyperglycemic Conditions. *Biomed Res Int* *2013*.
- Munk Pedersen, I., and Reed, J. (2004). Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk. Lymphoma* *45*, 2365–2372.
- Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C.E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* *104*, 2224–2234.
- Mustain, W.C., Rychahou, P.G., and Evers, B.M. (2011). The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* *18*, 75–82.
- Muzio, M., Apollonio, B., Scielzo, C., Frenquelli, M., Vandoni, I., Boussiotis, V., Caligaris-Cappio, F., and Ghia, P. (2008). Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* *112*, 188–195.
- Myers, R.M., Shearman, J.W., Kitching, M.O., Ramos-Montoya, A., Neal, D.E., and Ley, S.V. (2009). Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chem. Biol.* *4*, 503–525.
- Nabhan, C., Raca, G., and Wang, Y.L. (2015). Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol* *1*, 965–974.
- Nadezhdin, K.D., García-Carpio, I., Goncharuk, S.A., Mineev, K.S., Arseniev, A.S., and Vilar, M. (2016). Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization. *J. Biol. Chem.* *jbc.M116.723585*.
- Nelson, B.P., Gupta, R., Dewald, G.W., Paternoster, S.F., Rosen, S.T., and Peterson, L.C. (2007). Chronic Lymphocytic Leukemia FISH Panel Impact on Diagnosis. *Am J Clin Pathol* *128*, 323–332.
- Neste, E.V.D., Robin, V., Francart, J., Hagemeyer, A., Stul, M., Vandenberghe, P., Delannoy, A., Sonet, A., Deneys, V., Costantini, S., et al. (2007). Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* *21*, 1715–1722.
- Ng, A.P., and Alexander, W.S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery* *3*, 17002.
- Nguyen-Khac, F., Chevret, S., Roux, C., Touzeau, C., Cosson, A., Cymbalista, F., Feugier, P., Leprêtre, S., Bene, M.-C., Raynaud, S., et al. (2013). Mutational and Cytogenetic Analyses Of 177 CLL Patients With Trisomy 12: A Retrospective Study Of The CLL French Intergroup. *Blood* *122*, 4144–4144.
- Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J.C., Zvaifler, N.J., and Kipps, T.J. (2005). Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* *106*, 1012–1020.

- Nosheny, R.L., Ahmed, F., Yakovlev, A., Meyer, E.M., Ren, K., Tessarollo, L., and Mocchetti, I. (2007). Brain-derived neurotrophic factor prevents the nigrostriatal degeneration induced by human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 in vivo. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 2275–2284.
- Nouel, D., Faure, M.P., St Pierre, J.A., Alonso, R., Quirion, R., and Beaudet, A. (1997). Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J. Neurosci.* *17*, 1795–1803.
- Novak, A.J., Bram, R.J., Kay, N.E., and Jelinek, D.F. (2002). Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* *100*, 2973–2979.
- Nunes, C., Wong, R., Mason, M., Fegan, C., Man, S., and Pepper, C. (2012). Expansion of a CD8(+)/PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin. Cancer Res.* *18*, 678–687.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012a). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* *35*, 261–270.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012b). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences* *35*, 261–270.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* *427*, 843–848.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75<sup>NTR</sup>--live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 49–57.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452–19460.
- O'Brien, S., Furman, R.R., Coutre, S., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K., Sharman, J., Wierda, W., Jones, J., Zhao, W., et al. (2018). Single-agent ibrutinib in treatment-naïve and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood* *131*, 1910–1919.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053–1058.
- Ohman, L., Franzén, L., Rudolph, U., Birnbaumer, L., and Hörnquist, E.H. (2002). Regression of Peyer's patches in G alpha i2 deficient mice prior to colitis is associated with reduced expression of Bcl-2 and increased apoptosis. *Gut* *51*, 392–397.
- Ohtaki, Y., Ishii, G., Nagai, K., Ashimine, S., Kuwata, T., Hishida, T., Nishimura, M., Yoshida, J., Takeyoshi, I., and Ochiai, A. (2010). Stromal Macrophage Expressing CD204 is Associated with Tumor Aggressiveness in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* *5*, 1507–1515.
- Okuda, H., Kobayashi, A., Xia, B., Watabe, M., Pai, S.K., Hirota, S., Xing, F., Liu, W., Pandey, P.R., Fukuda, K., et al. (2012). Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor

progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells. *Cancer Res.* *72*, 537–547.

Olszewski, U., and Hamilton, G. (2009). Neurotensin signaling induces intracellular alkalization and interleukin-8 expression in human pancreatic cancer cells. *Mol Oncol* *3*, 204–213.

Os, A., Bürgler, S., Ribes, A.P., Funderud, A., Wang, D., Thompson, K.M., Tjønnfjord, G.E., Bogen, B., and Munthe, L.A. (2013). Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Are Activated and Proliferate in Response to Specific T Helper Cells. *Cell Reports* *4*, 566–577.

Oscier, D.G., Rose-Zerilli, M.J.J., Winkelmann, N., Gonzalez de Castro, D., Gomez, B., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Gardiner, A., Collins, A., et al. (2013). The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* *121*, 468–475.

Otten, U., Ehrhard, P., and Peck, R. (1989). Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 10059–10063.

Ouyang, Q., Gong, X., Xiao, H., Zhou, J., Xu, M., Dai, Y., Xu, L., Feng, H., Cui, H., and Yi, L. (2015). Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. *Mol. Cancer* *14*, 21.

Ouyang, Q., Zhou, J., Yang, W., Cui, H., Xu, M., and Yi, L. (2017). Oncogenic role of neurotensin and neurotensin receptors in various cancers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *44*, 841–846.

Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, Y.J., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., et al. (2015). Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* *126*, 1106–1117.

Pallasch, C.P., Ulbrich, S., Brinker, R., Hallek, M., Uger, R.A., and Wendtner, C.-M. (2009). Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leukemia Research* *33*, 460–464.

Palmer, S., Hanson, C.A., Zent, C.S., Porrata, L.F., LaPlant, B., Geyer, S.M., Markovic, S.N., Call, T.G., Bowen, D.A., Jelinek, D.F., et al. (2008). Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* *141*, 607–614.

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* *306*, 487–491.

Parry, H.M., Stevens, T., Oldreive, C., Zadran, B., McSkeane, T., Rudzki, Z., Paneesha, S., Chadwick, C., Stankovic, T., Pratt, G., et al. (2016). NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget* *7*, 68513–68526.

Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* *11*, 272–280.

Patel, A.B., Tsilioni, I., Leeman, S.E., and Theoharides, T.C. (2016). Neurotensin stimulates



sortilin and mTOR in human microglia inhibitable by methoxyluteolin, a potential therapeutic target for autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

Pearse, R.N., Swendeman, S.L., Li, Y., Rafii, D., and Hempstead, B.L. (2005). A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* *105*, 4429–4436.

Pedersen, I.M., Kitada, S., Leoni, L.M., Zapata, J.M., Karras, J.G., Tsukada, N., Kipps, T.J., Choi, Y.S., Bennett, F., and 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.

Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, D.P. (1997). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br. J. Cancer* *76*, 935–938.

Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, P. (1998). Elevated Bcl-2/Bax Are a Consistent Feature of Apoptosis Resistance in B-cell Chronic Lymphocytic Leukaemia and Are Correlated with In Vivo Chemoresistance. *Leukemia & Lymphoma* *28*, 355–361.

Pepper, C., Lin, T.T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., Austen, B., et al. (2008). Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* *112*, 3807–3817.

Perdiguerro, E.G., and Geissmann, F. (2013). Myb-Independent Macrophages: A Family of Cells That Develops with Their Tissue of Residence and Is Involved in Its Homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *78*, 91–100.

Pereira da Silva, L., Miguel Neves, B., Moura, L., Cruz, M.T., and Carvalho, E. (2014). Neurotensin Decreases the Proinflammatory Status of Human Skin Fibroblasts and Increases Epidermal Growth Factor Expression.

Philippen, A., Diener, S., Zenz, T., Döhner, H., Stilgenbauer, S., and Mertens, D. (2010). SYK carries no activating point mutations in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *British Journal of Haematology* *150*, 633–636.

Pinet, S., Bessette, B., Vedrenne, N., Lacroix, A., Richard, L., Jauberteau, M.-O., Battu, S., Lalloué, F., Pinet, S., Bessette, B., et al. (2016). TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget* *7*, 50349–50364.

Poggi, A., Prevosto, C., Catellani, S., Rocco, I., Garuti, A., and Zocchi, M.R. (2010). Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukemia cells. *British Journal of Haematology* *151*, 252.

Polk, A., Lu, Y., Wang, T., Seymour, E., Bailey, N.G., Singer, J.W., Boonstra, P.S., Lim, M.S., Malek, S., and Wilcox, R.A. (2016). Colony-Stimulating Factor-1 Receptor Is Required for Nurse-like Cell Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res.* *22*, 6118–6128.

Pollyea, D.A., Coutre, S., Gore, L., Adler, N., Harris, P., Phelps, M.A., Johnson, A.J., Ling, Y., Li, H., Gutman, J.A., et al. (2014). A Dose Escalation Study of Ibrutinib with Lenalidomide for Relapsed and Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *Blood* *124*, 1987–1987.

- Ponader, S., Chen, S.-S., Buggy, J.J., Balakrishnan, K., Gandhi, V., Wierda, W.G., Keating, M.J., O'Brien, S., Chiorazzi, N., and Burger, J.A. (2012). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* *119*, 1182–1189.
- Ponzoni, M., Doglioni, C., and Caligaris-Cappio, F. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Seminars in Diagnostic Pathology* *28*, 161–166.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* *402*, 884–888.
- Puehringer, D., Orel, N., Lüningschrör, P., Subramanian, N., Herrmann, T., Chao, M.V., and Sendtner, M. (2013). EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons. *Nat. Neurosci.* *16*, 407–415.
- Puiggros, A., Delgado, J., Rodriguez-Vicente, A., Collado, R., Aventín, A., Luño, E., Grau, J., Hernandez, J.Á., Marugán, I., Ardanaz, M., et al. (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *British Journal of Haematology* *163*, 47–54.
- Purroy, N., Abrisqueta, P., Carabia, J., Carpio, C., Palacio, C., Bosch, F., and Crespo, M. (2015). Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* *6*, 7632–7643.
- Qian, B.-Z., Zhang, H., Li, J., He, T., Yeo, E.-J., Soong, D.Y.H., Carragher, N.O., Munro, A., Chang, A., Bresnick, A.R., et al. (2015). FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J. Exp. Med.* *212*, 1433–1448.
- Qin, Z., Noffz, G., Mohaupt, M., and Blankenstein, T. (1997). Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *The Journal of Immunology* *159*, 770–776.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* *19*, 1423–1437.
- Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J.M., Barrena, S., Sánchez, M.L., Teodosio, C., Giraldo, P., Giralt, M., Pérez, M.C., et al. (2008). Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* *74*, 139–149.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., and Pasternack, B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *46*, 219–234.
- Rajagopal, R., and Chao, M.V. (2006). A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* *33*, 36–46.
- Ramez, M., Bagot, M., Nikolova, M., Boumsell, L., Vita, N., Chalon, P., Caput, D., Ferrara, P., and Bensussan, A. (2001). Functional characterization of neurotensin receptors in human cutaneous T cell lymphoma malignant lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 687–693.

- Rampazzo, E., Bonaldi, L., Trentin, L., Visco, C., Keppel, S., Giunco, S., Frezzato, F., Facco, M., Novella, E., Giaretta, I., et al. (2012). Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica* *97*, 56–63.
- Ramsay, A.G., Johnson, A.J., Lee, A.M., Gorgün, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J.C., and Gribben, J.G. (2008). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J. Clin. Invest.* *118*, 2427–2437.
- Ramsay, A.G., Evans, R., Kiaii, S., Svensson, L., Hogg, N., and Gribben, J.G. (2013). Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1–directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide. *Blood* *121*, 2704–2714.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 707–747.
- Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., et al. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *351*, 893–901.
- Rassenti, L.Z., Jain, S., Keating, M.J., Wierda, W.G., Grever, M.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Brown, J.R., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., et al. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *112*, 1923–1930.
- Reed, J.C. (1996). Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst. Mitt.* 72–100.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *361*, 1545–1564.
- Reiners, K.S., Topolar, D., Henke, A., Simhadri, V.R., Kessler, J., Sauer, M., Bessler, M., Hansen, H.P., Tawadros, S., Herling, M., et al. (2013). Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood* *121*, 3658–3665.
- Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., Culouscou, J.-M., Le Fur, G., Soubrié, P., Caput, D., et al. (2002). Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res.* *953*, 63–72.
- René, C., Prat, N., Thuizat, A., Broctawik, M., Avinens, O., and Eliaou, J.-F. (2014). Comprehensive characterization of immunoglobulin gene rearrangements in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *J Cell Mol Med* *18*, 979–990.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* *338*, 383–384.
- Ribatti, D., Mangialardi, G., and Vacca, A. (2006). Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clin. Exp. Med.* *6*, 145–149.
- Richard, F., Barroso, S., Martinez, J., Labbé-Jullié, C., and Kitabgi, P. (2001). Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin

receptor 2. *Mol. Pharmacol.* *60*, 1392–1398.

Richardson, S.J., Matthews, C., Catherwood, M.A., Alexander, H.D., Carey, B.S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Copplesstone, J.A., et al. (2006). ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* *107*, 3584–3592.

Riches, J.C., Davies, J.K., McClanahan, F., Fatah, R., Iqbal, S., Agrawal, S., Ramsay, A.G., and Gribben, J.G. (2013). T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* *121*, 1612–1621.

Rioux, F., Quirion, R., K  rouac, R., and St-Pierre, S. (1982). The pressor effects of neurotensin and related peptides in rats. *Neuropeptides* *2*, 295–299.

Roberts, A.W., Davids, M.S., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Puvvada, S.D., Gerecitano, J.F., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Brown, J.R., Gressick, L., et al. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* *374*, 311–322.

Robertson, L.E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M.J., and McDonnell, T.J. (1996). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* *10*, 456–459.

Rodríguez-T  bar, A., Dechant, G., G  tz, R., and Barde, Y.A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* *11*, 917–922.

Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W.W.A., Z  rn, C., and Reth, M. (2002). Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol. Cell* *10*, 1057–1069.

Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., de Vries, E., Paauwe, M., Braster, R., Verheij, M., and Borst, J. (2014). Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* *123*, 2806–2815.

Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., Tabilio, A., Di Ianni, M., Fettucciari, K., Bartoli, A., Coaccioli, S., Screpanti, I., and Marconi, P. (2009). Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* *113*, 856–865.

Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C.C., Zhang, X.D., Walker, M.M., and Hondermarck, H. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* *6*, 10473–10486.

Rosén, A., Murray, F., Evaldsson, C., and Rosenquist, R. (2010). Antigens in chronic lymphocytic leukemia—Implications for cell origin and leukemogenesis. *Seminars in Cancer Biology* *20*, 400–409.

Rosenblum, S., Smith, T.N., Wang, N., Chua, J.Y., Westbroek, E., Wang, K., and Guzman, R. (2015). BDNF Pretreatment of Human Embryonic-Derived Neural Stem Cells Improves Cell Survival and Functional Recovery after Transplantation in Hypoxic–Ischemic Stroke. *Cell Transplant* *24*, 2449–2461.

Rose-Zerilli, M.J.J., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Rodríguez, A.E., Chaplin, T., Gardiner,

- A., Steele, A.J., Collins, A., Young, B.D., et al. (2014). ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica* 99, 736–742.
- Rosini, P., De Chiara, G., Lucibello, M., Garaci, E., Cozzolino, F., and Torcia, M. (2000). NGF withdrawal induces apoptosis in CESS B cell line through p38 MAPK activation and Bcl-2 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 753–759.
- Rossi, D., and Gaidano, G. (2012). ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica* 97, 5–8.
- Rossi, D., Sozzi, E., Puma, A., De Paoli, L., Rasi, S., Spina, V., Gozzetti, A., Tassi, M., Cencini, E., Raspadori, D., et al. (2009a). The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br. J. Haematol.* 146, 64–75.
- Rossi, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Sozzi, E., Cresta, S., Rasi, S., Paoli, L.D., Spina, V., Gattei, V., Capello, D., et al. (2009b). The Prognostic Value of TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Independent of Del17p13: Implications for Overall Survival and Chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 15, 995–1004.
- Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., Fangazio, M., Vaisitti, T., Monti, S., Chiaretti, S., et al. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 118, 6904–6908.
- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Giudice, I.D., Fabbri, G., Brusca, A., et al. (2012a). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 2854–2862.
- Rossi, D., Rasi, S., Fabbri, G., Spina, V., Fangazio, M., Forconi, F., Marasca, R., Laurenti, L., Brusca, A., Cerri, M., et al. (2012b). Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 521–529.
- Rossi, D., Spina, V., Forconi, F., Capello, D., Fangazio, M., Rasi, S., Martini, M., Gattei, V., Ramponi, A., Larocca, L.M., et al. (2012c). Molecular history of Richter syndrome: origin from a cell already present at the time of chronic lymphocytic leukemia diagnosis. *Int. J. Cancer* 130, 3006–3010.
- Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Brusca, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., et al. (2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121, 1403–1412.
- Rossi, D., Terzi-di-Bergamo, L., Paoli, L.D., Cerri, M., Ghilardi, G., Chiarenza, A., Bulian, P., Visco, C., Mauro, F.R., Morabito, F., et al. (2015). Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 126, 1921–1924.
- Rossi, D.J., Jamieson, C.H.M., and Weissman, I.L. (2008). Stem cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132, 681–696.
- Rostène, W.H., and Alexander, M.J. (1997). Neurotensin and neuroendocrine regulation.

Front Neuroendocrinol 18, 115–173.

Roussy, G., Dansereau, M.-A., Doré-Savard, L., Belleville, K., Beaudet, N., Richelson, E., and Sarret, P. (2008). Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *Journal of Neurochemistry* 105, 1100–1114.

Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203–233.

Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., and Barker, P.A. (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 23097–23104.

Rozman, C., and Montserrat, E. (1995). Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 333, 1052–1057.

Ruffell, B., and Coussens, L.M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 27, 462–472.

Ruland, J., and Mak, T.W. (2003). Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol. Rev.* 193, 93–100.

Rushton, L., Schnatter, A.R., Tang, G., and Glass, D.C. (2014). Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers. *Br J Cancer* 110, 783–787.

Saada, S., Marget, P., Fauchais, A.-L., Lise, M.-C., Chemin, G., Sindou, P., Martel, C., Delpy, L., Vidal, E., Jaccard, A., et al. (2012). Differential Expression of Neurotensin and Specific Receptors, NTSR1 and NTSR2, in Normal and Malignant Human B Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 189, 5293–5303.

Samah, B., Porcheray, F., and Gras, G. (2008). Neurotrophins modulate monocyte chemotaxis without affecting macrophage function. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 476–486.

Sánchez-Sánchez, J., Arévalo, J., Sánchez-Sánchez, J., and Arévalo, J.C. (2017). A Review on Ubiquitination of Neurotrophin Receptors: Facts and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 630.

Sarfati, M., Chevret, S., Chastang, C., Biron, G., Stryckmans, P., Delespesse, G., Binet, J.L., Merle-Beral, H., and Bron, D. (1996). Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88, 4259–4264.

Sarret, P., Beaudet, A., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1998). Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 394, 344–356.

Sarret, P., Gendron, L., Kilian, P., Nguyen, H.M.K., Gallo-Payet, N., Payet, M.-D., and Beaudet, A. (2002). Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 277, 36233–36243.

Sarret, P., Perron, A., Stroh, T., and Beaudet, A. (2003). Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 461, 520–538.

Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T.G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E.L., Liu, H., Price, H.P., Gesk, S., Steinemann, D., et al. (2001). The BCL11 gene family: involvement of

BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98, 3413–3420.

Saulep-Easton, D., Vincent, F.B., Quah, P.S., Wei, A., Ting, S.B., Croce, C.M., Tam, C., and Mackay, F. (2016). The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia* 30, 163–172.

Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J., and El-Deiry, W.S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* 4, 842–849.

Scarfò, L., Ferreri, A.J.M., and Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 104, 169–182.

Scharenberg, A.M., Humphries, L.A., and Rawlings, D.J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 778–789.

Schena, M., Gottardi, D., Ghia, P., Larsson, L.-G., Carlsson, M., Nilsson, K., and Caligaris-Cappio, F. (1993). The Role of Bcl-2 in the Pathogenesis of B Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 11, 173–179.

Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S.K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., et al. (2003). Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *Journal of Experimental Medicine* 198, 1391–1402.

Schober, A., Huber, K., Fey, J., and Unsicker, K. (1998). Distinct populations of macrophages in the adult rat adrenal gland: a subpopulation with neurotrophin-4-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 291, 365–373.

Schoppmann, S.F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., and Kerjaschki, D. (2002). Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 161, 947–956.

Schotte, A., Rostène, W., and Laduron, P.M. (1988). Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system. *J. Neurochem.* 50, 1026–1031.

Schriever, F., and Huhn, D. (2003). New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 63, 953–969.

Schroers, R., Griesinger, F., Trümper, L., Haase, D., Kulle, B., Klein-Hitpass, L., Sellmann, L., Dührsen, U., and Dürig, J. (2005). Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19, 750–758.

Schuhmann, B., Dietrich, A., Sel, S., Hahn, C., Klingenspor, M., Lommatzsch, M., Gudermann, T., Braun, A., Renz, H., and Nockher, W.A. (2005). A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J. Neuroimmunol.* 163, 15–23.

Schulz, A., Dürr, C., Zenz, T., Döhner, H., Stilgenbauer, S., Lichter, P., and Seiffert, M. (2013). Lenalidomide reduces survival of chronic lymphocytic leukemia cells in primary cocultures by altering the myeloid microenvironment. *Blood* 121, 2503–2511.

Schulz, C., Perdiguero, E.G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A Lineage of Myeloid Cells

Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* 336, 86–90.

Schulz, S., Röcken, C., Ebert, M.P.A., and Schulz, S. (2006). Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. *J. Endocrinol.* 191, 121–128.

Scielzo, C., Apollonio, B., Scarfò, L., Janus, A., Muzio, M., Ten Hacken, E., Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2011). The functional in vitro response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 25, 1760–1767.

Secreto, F., Manske, M., Price-Troska, T., Ziesmer, S., Hodge, L.S., Ansell, S.M., Cerhan, J.R., and Novak, A.J. (2014). B-cell activating factor-receptor specific activation of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in lymphoma B cells. *Leukemia & Lymphoma* 55, 1884–1892.

Sehgal, I., Powers, S., Huntley, B., Powis, G., Pittelkow, M., and Maihle, N.J. (1994). Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4673–4677.

Sellmann, L., Gesk, S., Walter, C., Ritgen, M., Harder, L., Martín-Subero, J.I., Schroers, R., Siemer, D., Nüchel, H., Dyer, M.J.S., et al. (2007). Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 138, 217–220.

Sellmann, L., de Beer, D., Bartels, M., Opalka, B., Nüchel, H., Dührsen, U., Dürig, J., Seifert, M., Siemer, D., Küppers, R., et al. (2011). Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int. J. Hematol.* 93, 74–82.

Seymour, J.F., Kipps, T.J., Eichhorst, B., Hillmen, P., D’Rozario, J., Assouline, S., Owen, C., Gerecitano, J., Robak, T., De la Serna, J., et al. (2018). Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 378, 1107–1120.

Shanafelt, T.D., Ghia, P., Lanasa, M.C., Landgren, O., and Rawstron, A.C. (2010). Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 24, 512–520.

Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1–29.

Shimizu, S., Tsukada, J., Sugimoto, T., Kikkawa, N., Sasaki, K., Chazono, H., Hanazawa, T., Okamoto, Y., and Seki, N. (2008). Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int. J. Cancer* 123, 1816–1823.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–795.

Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., Damme, J.V., and Mantovani, A. (2000). Autocrine Production of IL-10 Mediates Defective IL-12 Production and NF- $\kappa$ B Activation in Tumor-Associated Macrophages. *The Journal of Immunology* 164, 762–767.

Sierra-Filardi, E., Nieto, C., Domínguez-Soto, A., Barroso, R., Sánchez-Mateos, P., Puig-Kroger, A., López-Bravo, M., Joven, J., Ardavín, C., Rodríguez-Fernández, J.L., et al. (2014).



CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J. Immunol.* *192*, 3858–3867.

da Silva, L., Neves, B.M., Moura, L., Cruz, M.T., and Carvalho, E. (2011). Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 1863–1871.

Siveen, K.S., and Kuttan, G. (2009). Role of macrophages in tumour progression. *Immunol. Lett.* *123*, 97–102.

Sivina, M., Hartmann, E., Kipps, T.J., Rassenti, L., Krupnik, D., Lerner, S., LaPushin, R., Xiao, L., Huang, X., Werner, L., et al. (2011). CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 1662–1669.

Smith, S.M., Pitcher, B.N., Jung, S.-H., Bartlett, N.L., Wagner-Johnston, N., Park, S.I., Richards, K.L., Cashen, A.F., Jaslowski, A., Smith, S.E., et al. (2017). Safety and tolerability of idelalisib, lenalidomide, and rituximab in relapsed and refractory lymphoma: the Alliance for Clinical Trials in Oncology A051201 and A051202 phase 1 trials. *Lancet Haematol* *4*, e176–e182.

Sniderhan, L.F., Garcia-Bates, T.M., Burgart, M., Bernstein, S.H., Phipps, R.P., and Maggirwar, S.B. (2009). Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp. Hematol.* *37*, 1295–1309.

Somaï, S., Gompel, A., Rostène, W., and Forgez, P. (2002). Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *295*, 482–488.

Souazé, F., Viardot-Foucault, V., Rouillet, N., Toy-Miou-Leong, M., Gompel, A., Bruyneel, E., Comperat, E., Faux, M.C., Mareel, M., Rostène, W., et al. (2006a). Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ $\beta$ -catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* *27*, 708–716.

Souazé, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A., and Forgez, P. (2006b). Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res.* *66*, 6243–6249.

Spaargaren, M., Beuling, E.A., Rurup, M.L., Meijer, H.P., Klok, M.D., Middendorp, S., Hendriks, R.W., and Pals, S.T. (2003). The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLC $\gamma$ 2. *J. Exp. Med.* *198*, 1539–1550.

Spaner, D.E., Shi, Y., White, D., Mena, J., Hammond, C., Tomic, J., He, L., Tomai, M.A., Miller, R.L., Booth, J., et al. (2006). Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* *20*, 286–295.

Speedy, H.E., Di Bernardo, M.C., Sava, G.P., Dyer, M.J.S., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N.J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K.E., et al. (2014). A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* *46*, 56–60.

Stadanlick, J.E., Kaileh, M., Karnell, F.G., Scholz, J.L., Miller, J.P., Quinn, W.J., Brezski, R.J., Trembl, L.S., Jordan, K.A., Monroe, J.G., et al. (2008). Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF- $\kappa$ B substrate for prosurvival BLyS signaling. *Nat. Immunol.* *9*, 1379–1387.

- Stamatopoulos, B., Meuleman, N., De Bruyn, C., Pieters, K., Mineur, P., Le Roy, C., Saint-Georges, S., Varin-Blank, N., Cymbalista, F., Bron, D., et al. (2012). AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 97, 608–615.
- Starczynski, J., Pepper, C., Pratt, G., Hooper, L., Thomas, A., Milligan, D., Bentley, P., and Fegan, C. (2005). Common Polymorphism G(-248)A in the Promoter Region of the *bax* Gene Results in Significantly Shorter Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Once Treatment Is Initiated. *JCO* 23, 1514–1521.
- Sternini, C., Su, D., Arakawa, J., de Giorgio, R., Rickman, D.W., Davis, B.M., Albers, K.M., and Brecha, N.C. (1996). Cellular localization of Pan-trk immunoreactivity and *trkC* mRNA in the enteric nervous system. *J. Comp. Neurol.* 368, 597–607.
- Steurer, M., Montillo, M., Scarfò, L., Mauro, F.R., Andel, J., Wildner, S., Trentin, L., Janssens, A., Burgstaller, S., Kruschinski, A., et al. (2014). Results from a Phase IIa Study of the Anti-CXCL12 Spiegelmer Olaptosed Pegol (NOX-A12) in Combination with Bendamustine/Rituximab in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 124, 1996–1996.
- Stevenson, F.K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103, 4389–4395.
- Stevenson, F.K., Krysov, S., Davies, A.J., Steele, A.J., and Packham, G. (2011). B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118, 4313–4320.
- Stoeger, Z.M., Wakai, M., Tse, D.B., Vinciguerra, V.P., Allen, S.L., Budman, D.R., Lichtman, S.M., Schulman, P., Weiselberg, L.R., and Chiorazzi, N. (1989). Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 169, 255–268.
- Stilgenbauer, S., Sander, S., Bullinger, L., Benner, A., Leupolt, E., Winkler, D., Kröber, A., Kienle, D., Lichter, P., and Döhner, H. (2007). Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 92, 1242–1245.
- Stilgenbauer, S., Zenz, T., Winkler, D., Bühler, A., Schlenk, R.F., Groner, S., Busch, R., Hensel, M., Dührsen, U., Finke, J., et al. (2009). Subcutaneous Alemtuzumab in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Results and Prognostic Marker Analyses From the CLL2H Study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *JCO* 27, 3994–4001.
- Stilgenbauer, S., Schnaiter, A., Paschka, P., Zenz, T., Rossi, M., Döhner, K., Bühler, A., Böttcher, S., Ritgen, M., Kneba, M., et al. (2014). Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 123, 3247–3254.
- Strati, P., and Caligaris-Cappio, F. (2011). A matter of debate in chronic lymphocytic leukemia: is the occurrence of autoimmune disorders an indicator of chronic lymphocytic leukemia therapy? *Curr Opin Oncol* 23, 455–460.
- Strati, P., Keating, M.J., O'Brien, S.M., Burger, J., Ferrajoli, A., Jain, N., Tambaro, F.P., Estrov, Z., Jorgensen, J., Challagundla, P., et al. (2014). Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood* 123, 3727–3732.

- Suda, K. (2017). Tumor-associated macrophages-additional effectors at anti-PD-1/PD-L1 therapy? *J Thorac Dis* 9, 4197–4200.
- Sun, Y.-J., Maeno, H., Aoki, S., and Wada, K. (2001). Mouse neurotensin receptor 2 gene (Ntsr2): genomic organization, transcriptional regulation and genetic mapping on chromosome 12. *Molecular Brain Research* 95, 167–171.
- Suresh, S., and Irvine, A.E. (2015). The NOTCH signaling pathway in normal and malignant blood cell production. *J. Cell Commun. Signal.* 9, 5–13.
- Swartz, M.A., Iida, N., Roberts, E.W., Sangaletti, S., Wong, M.H., Yull, F.E., Coussens, L.M., and DeClerck, Y.A. (2012). Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* 72, 2473–2480.
- Sweeney, T., Spurgeon, S.E., Tyner, J.W., Agarwal, A., Ho, H., Traer, E., Lee, P., Chantry, D., Druker, B.J., and Loriaux, M. (2015). Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R) As a Potential Novel Therapeutic Target in CLL. *Blood* 126, 4439–4439.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390.
- Swift, S.L., Burns, J.E., and Maitland, N.J. (2010). Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res.* 70, 347–356.
- Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., and Imamura, M. (2005). Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11, 7322–7327.
- Tajbakhsh, A., Mokhtari-Zaer, A., Rezaee, M., Afzaljavan, F., Rivandi, M., Hassanian, S.M., Ferns, G.A., Pasdar, A., and Avan, A. (2017). Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *Journal of Cellular Biochemistry* 118, 2502–2515.
- Takei, N., Torres, E., Yuhara, A., Jongsma, H., Otto, C., Korhonen, L., Abiru, Y., Skoglösa, Y., Schütz, G., Hatanaka, H., et al. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes the survival of basal forebrain cholinergic neurons in vitro and in vivo: comparison with effects of nerve growth factor. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2273–2280.
- Tam, C.S., Shanafelt, T.D., Wierda, W.G., Abruzzo, L.V., Van Dyke, D.L., O'Brien, S., Ferrajoli, A., Lerner, S.A., Lynn, A., Kay, N.E., et al. (2009). De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 114, 957–964.
- Tanaka, K., Masu, M., and Nakanishi, S. (1990). Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4, 847–854.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1998). Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709–726.
- Tapley, P., Lamballe, F., and Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371–381.

- Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2927–2931.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* 25, 5455–5463.
- The International CLL-IPI working group (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* 17, 779–790.
- Thomas, J.B., Giddings, A.M., Wiethe, R.W., Olepu, S., Warner, K.R., Sarret, P., Gendron, L., Longpre, J.-M., Zhang, Y., Runyon, S.P., et al. (2014). Identification of 1-([1-(4-fluorophenyl)-5-(2-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]carbonyl)amino)cyclohexane carboxylic acid as a selective nonpeptide neurotensin receptor type 2 compound. *J. Med. Chem.* 57, 5318–5332.
- Thomas, S.M., DeMarco, M., D’Arcangelo, G., Halegoua, S., and Brugge, J.S. (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* 68, 1031–1040.
- Thompson, P.A., and Wierda, W.G. (2016). Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood* 127, 279–286.
- Thompson, A.A., Talley, J.A., Do, H.N., Kagan, H.L., Kunkel, L., Berenson, J., Cooper, M.D., Saxon, A., and Wall, R. (1997). Aberrations of the B-Cell Receptor B29 (CD79b) Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 90, 1387–1394.
- Thompson, P.A., O’Brien, S.M., Wierda, W.G., Ferrajoli, A., Stingo, F., Smith, S.C., Burger, J.A., Estrov, Z., Jain, N., Kantarjian, H.M., et al. (2015). Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer* 121, 3612–3621.
- Thompson, P.A., Tam, C.S., O’Brien, S.M., Wierda, W.G., Stingo, F., Plunkett, W., Smith, S.C., Kantarjian, H.M., Freireich, E.J., and Keating, M.J. (2016). Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 127, 303–309.
- Till, K.J., Lin, K., Zuzel, M., and Cawley, J.C. (2002). The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 99, 2977–2984.
- Tilley, D.G., Kim, I.-M., Patel, P.A., Violin, J.D., and Rockman, H.A. (2009).  $\beta$ -Arrestin Mediates  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor-Epidermal Growth Factor Receptor Interaction and Downstream Signaling. *J Biol Chem* 284, 20375–20386.
- Tjønnfjord, G.E., Jønsson, V., Ly, B.E., and Johannesen, T.B. (2012). Familial occurrence of chronic lymphocytic leukaemia in Norway. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 132, 2060–2063.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L., and Garaci, E. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85, 345–356.
- Tsimberidou, A.-M., and Keating, M.J. (2005). Richter syndrome: biology, incidence, and

therapeutic strategies. *Cancer* 103, 216–228.

Tsimberidou, A.M., O'Brien, S.M., Cortes, J.E., Faderl, S., Andreeff, M., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., and Giles, F.J. (2002). Phase II study of fludarabine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphamide, cisplatin and GM-CSF (FACPGM) in patients with Richter's syndrome or refractory lymphoproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 43, 767–772.

Tsukada, N., Burger, J.A., Zvaifler, N.J., and Kipps, T.J. (2002). Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 1030–1037.

Tsutsui, S., Yasuda, K., Suzuki, K., Tahara, K., Higashi, H., and Era, S. (2005). Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology Reports* 14, 425–431.

Ujjani, C., Wang, H., Skarbnik, A., Trivedi, N., Ramzi, P., Khan, N., and Cheson, B.D. (2018). A phase 1 study of lenalidomide and ibrutinib in combination with rituximab in relapsed and refractory CLL. *Blood Adv* 2, 762–768.

Uren, R.T., and Turnley, A.M. (2014). Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player. *Front Mol Neurosci* 7.

Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* 14, 54–61.

Vaillant, A.R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (1999). Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J. Cell Biol.* 146, 955–966.

Vaisitti, T., Aydin, S., Rossi, D., Cottino, F., Bergui, L., D'Arena, G., Bonello, L., Horenstein, A.L., Brennan, P., Pepper, C., et al. (2010). CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 24, 958–969.

Valerie, N.C.K., Casarez, E.V., Dasilva, J.O., Dunlap-Brown, M.E., Parsons, S.J., Amorino, G.P., and Dziegielewska, J. (2011). Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *Cancer Res.* 71, 6817–6826.

Van der Auwera, I., Yu, W., Suo, L., Van Neste, L., van Dam, P., Van Marck, E.A., Pauwels, P., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., and Van Laere, S.J. (2010). Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. *PLoS ONE* 5, e12616.

Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M.S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., et al. (2018). Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK-cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* blood-2017-07-796342.

Vasiadi, M., Mondolfi, A.P., Alysandratos, K.-D., Therianou, A., Katsarou-Katsari, A., Petrakopoulou, T., Theoharidis, A., Miniati, A., and Theoharides, T.C. (2013). Neurotensin serum levels and skin gene expression are increased in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 169, 695–699.

Vega, J.A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., and Germanà, A. (2003).

Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* 203, 1–19.

Vérollet, C., Charrière, G.M., Labrousse, A., Cougoule, C., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2011). Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur. J. Immunol.* 41, 2805–2813.

Véronèse, L., Tournilhac, O., Callanan, M., Prie, N., Kwiatkowski, F., Combes, P., Chauvet, M., Davi, F., Gouas, L., Verrelle, P., et al. (2013). Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27, 490–493.

Vias, M., Burt, G., Culig, Z., Veerakumarasivam, A., Neal, D.E., and Mills, I.G. (2007). A role for neurotensin in bicalutamide resistant prostate cancer cells. *Prostate* 67, 190–202.

Vincent, J.P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 302–309.

Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Dumont, X., Kaghad, M., Gully, D., Le Fur, G., Ferrara, P., and Caput, D. (1993). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett.* 317, 139–142.

Vita, N., Oury-Donat, F., Chalon, P., Guillemot, M., Kaghad, M., Bachy, A., Thurneyssen, O., Garcia, S., Poinot-Chazel, C., Casellas, P., et al. (1998). Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Pharmacol.* 360, 265–272.

Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594–604.

Vrhovac, R., Delmer, A., Tang, R., Marie, J.P., Zittoun, R., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1998). Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 91, 4694–4700.

Walker, N., Lepee-Lorgeoux, I., Fournier, J., Betancur, C., Rostene, W., Ferrara, P., and Caput, D. (1998). Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 193–200.

Walsby, E., Buggins, A., Devereux, S., Jones, C., Pratt, G., Brennan, P., Fegan, C., and Pepper, C. (2014). Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123, 3607–3617.

Wang, G.-D., Liu, Y.-X., Wang, X., Zhang, Y.-L., Zhang, Y.-D., and Xue, F. (2017). The SDF-1/CXCR4 axis promotes recovery after spinal cord injury by mediating bone marrow-derived from mesenchymal stem cells. *Oncotarget* 8, 11629–11640.

Wang, J.-G., Li, N.-N., Li, H.-N., Cui, L., and Wang, P. (2011a). Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides* 45, 151–156.

Wang, J.-M., Chao, J.-R., Chen, W., Kuo, M.-L., Yen, J.J.-Y., and Yang-Yen, H.-F. (1999). The Antiapoptotic Gene *mcl-1* Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex Containing CREB. *Molecular and Cellular Biology* 19, 6195–6206.

Wang, L., Friess, H., Zhu, Z., Graber, H., Zimmermann, A., Korc, M., Reubi, J.C., and

- Büchler, M.W. (2000). Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease. *Clin. Cancer Res.* 6, 566–571.
- Wang, L., Lawrence, M.S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D.S., Zhang, L., et al. (2011b). SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 365, 2497–2506.
- Wang, T.-C., Luo, S.-J., Lin, C.-L., Chang, P.-J., and Chen, M.-F. (2015). Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 32, 73–81.
- Wang, W.-T., Zhu, H.-Y., Wu, Y.-J., Xia, Y., Wu, J.-Z., Wu, W., Liang, J.-H., Wang, L., Fan, L., Li, J.-Y., et al. (2018). Elevated absolute NK cell counts in peripheral blood predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 144, 449–457.
- Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Stiles, C.D., and Segal, R.A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* 39, 323–336.
- Wawrzyniak, E., Kotkowska, A., Blonski, J.Z., Siemieniuk-Rys, M., Ziolkowska, E., Giannopoulos, K., Robak, T., and Korycka-Wolowiec, A. (2014). Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *European Journal of Haematology* 92, 91–101.
- Weagel, E., Smith, C., Liu, P.G., Robison, R., and O’Neill, K. (2015). Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 6, 1–8.
- Weber, F., Byrne, S.N., Le, S., Brown, D.A., Breit, S.N., Scolyer, R.A., and Halliday, G.M. (2005). Transforming growth factor- $\beta$ 1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother* 54, 898–906.
- Weeraratna, A.T., Dalrymple, S.L., Lamb, J.C., Denmeade, S.R., Miknyoczki, S., Dionne, C.A., and Isaacs, J.T. (2001). Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 2237–2245.
- Weerdt, I. de, Terpstra, S., Hofland, T., Lameris, R., Bruin, R.C.G. de, Levin, M.-D., Remmerswaal, E.B.M., Berge, I.J.M. ten, Tonino, S.H., Gruijl, T.D. de, et al. (2015). Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells Are Susceptible to  $\gamma\delta$ -T Cell Mediated Killing, Provided CLL-Derived  $\gamma\delta$ -T Cell Dysfunction Can be Reversed. *Blood* 126, 2914–2914.
- Weiss, N.S. (1979). Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl Cancer Inst Monogr* 139–142.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.
- Wierda, W., O’Brien, S., Wen, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Thomas, D., Do, K.-A., Cortes, J., Koller, C., Beran, M., et al. (2005). Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23, 4070–4078.
- Wierda, W.G., O’Brien, S., Wang, X., Faderl, S., Ferrajoli, A., Do, K.-A., Garcia-Manero, G., Cortes, J., Thomas, D., Koller, C.A., et al. (2011). Multivariable Model for Time to First

Treatment in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* 29, 4088–4095.

Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrickson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z., et al. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101, 4944–4951.

Willimott, S., and Wagner, S.D. (2010). Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1571–1575.

Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloue, F., and Jauberteau, M.-O. (2014). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *Journal of Cell Science* 127, 3983–3997.

Witz, I.P., and Levy-Nissenbaum, O. (2006). The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett.* 242, 1–10.

Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M.T., Barker, P.A., and Moscat, J. (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 7709–7712.

Woyach, J.A., Johnson, A.J., and Byrd, J.C. (2012a). The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 120, 1175–1184.

Woyach, J.A., Lozanski, G., Ruppert, A.S., Lozanski, A., Blum, K.A., Jones, J.A., Flynn, J.M., Johnson, A.J., Grever, M.R., Heerema, N.A., et al. (2012b). Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia* 26, 1442–1444.

Woyach, J.A., Smucker, K., Smith, L.L., Lozanski, A., Zhong, Y., Ruppert, A.S., Lucas, D., Williams, K., Zhao, W., Rassenti, L., et al. (2014a). Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood* 123, 1810–1817.

Woyach, J.A., Furman, R.R., Liu, T.-M., Ozer, H.G., Zapatka, M., Ruppert, A.S., Xue, L., Li, D.H.-H., Steggerda, S.M., Versele, M., et al. (2014b). Resistance Mechanisms for the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *New England Journal of Medicine* 370, 2286–2294.

Woyach, J.A., Ruppert, A.S., Guinn, D., Lehman, A., Blachly, J.S., Lozanski, A., Heerema, N.A., Zhao, W., Coleman, J., Jones, D., et al. (2017). BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 35, 1437–1443.

Wu, C.J. (2012). CLL clonal heterogeneity: an ecology of competing subpopulations. *Blood* 120, 4117–4118.

Wu, C., Lai, C.F., and Mobley, W.C. (2001). Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J. Neurosci.* 21, 5406–5416.

Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., Schafer, P., and Bartlett, J.B. (2008). lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 14, 4650–4657.

Wu, Z., Martinez-Fong, D., Trédaniel, J., and Forgez, P. (2013). Neurotensin and its high



affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3.

Xia, D., Li, W., Zhang, L., Qian, H., Yao, S., and Qi, X. (2014). RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Neoplasma* 61, 523–532.

Xiao, P., Long, X., Zhang, L., Ye, Y., Guo, J., Liu, P., Zhang, R., Ning, J., Yu, W., Wei, F., et al. (2018). Neurotensin/IL-8 pathway orchestrates local inflammatory response and tumor invasion by inducing M2 polarization of Tumor-Associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells. *OncoImmunology* 7, e1440166.

Yaktapour, N., Übelhart, R., Schüler, J., Aumann, K., Dierks, C., Burger, M., Pfeifer, D., Jumaa, H., Veelken, H., Brummer, T., et al. (2013). Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 122, 1621–1633.

Yamada, M., Yamada, M., Lombet, A., Forgez, P., and Rostène, W. (1998). Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci.* 62, PL 375-380.

Yamamoto, T., Yamanashi, Y., and Toyoshima, K. (1993). Association of Src-Family Kinase Lyn with B-Cell Antigen Receptor. *Immunological Reviews* 132, 187–206.

Yan, H., and Chao, M.V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 266, 12099–12104.

Yano, H., Torkin, R., Martin, L.A., Chao, M.V., and Teng, K.K. (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J. Neurosci.* 29, 14790–14802.

Yeiser, E.C., Rutkoski, N.J., Naito, A., Inoue, J., and Carter, B.D. (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in *traf6*<sup>-/-</sup> mice. *J. Neurosci.* 24, 10521–10529.

Yi, L., Xiao, H., Xu, M., Ye, X., Hu, J., Li, F., Li, M., Luo, C., Yu, S., Bian, X., et al. (2011). Glioma-initiating cells: A predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *Journal of Neuroimmunology* 232, 75–82.

York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., and Stork, P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622–626.

Younes, M., Wu, Z., Dupouy, S., Lupo, A.M., Mourra, N., Takahashi, T., Fléjou, J.F., Trédaniel, J., Régnard, J.F., Damotte, D., et al. (2014). Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 5, 8252–8269.

Young, J.-A.H. (2011). Epidemiology and management of infectious complications of contemporary management of chronic leukemias. *Infect Disord Drug Targets* 11, 3–10.

Ysebaert, L., and Fournié, J.-J. (2011). Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 52, 1404–1406.

Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1931–

1936.

Yuille, M.R., Houlston, R.S., and Catovsky, D. (1998). Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 12, 1696–1698.

Zage, P.E., Graham, T.C.N., Zeng, L.Z.M., Fang, W., Pien, C., Thress, K., Omer, C.A., Brown, J.L., and Zweidler-McKay, P.A. (2011). The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. *Cancer* 117, 1321–1391.

Zamarron, B.F., and Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 651–658.

Zapata, G.P.-C. and J.M. (2012). Mouse Models of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Chronic Lymphocytic Leukemia*.

Zaynagetdinov, R., Sherrill, T.P., Polosukhin, V.V., Han, W., Ausborn, J.A., McLoed, A.G., McMahan, F.B., Gleaves, L.A., Degryse, A.L., Stathopoulos, G.T., et al. (2011). A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. *J. Immunol.* 187, 5703–5711.

Zelenetz, A.D., Barrientos, J.C., Brown, J.R., Coiffier, B., Delgado, J., Egyed, M., Ghia, P., Illés, Á., Jurczak, W., Marlton, P., et al. (2017). Idelalisib or placebo in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: interim results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 18, 297–311.

Zent, C.S., and Kay, N.E. (2010). Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol* 23, 47–59.

Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., Smardova, J., Benner, A., Soussi, T., Helfrich, H., Heuberger, M., Hoth, P., Fuge, M., et al. (2010a). *TP53* mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 24, 2072–2079.

Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Häbe, S., Winkler, D., Bühler, A., Edelmann, J., Bergmann, M., Hopfinger, G., et al. (2010b). *TP53* Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* 28, 4473–4479.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clin Cancer Res* 14, 123–129.

Zhang, X.Q., Mu, J.W., Wang, H.B., Jolkkonen, J., Liu, T.T., Xiao, T., Zhao, M., Zhang, C.D., and Zhao, C.S. (2016). Increased protein expression levels of pCREB, BDNF and SDF-1/CXCR4 in the hippocampus may be associated with enhanced neurogenesis induced by environmental enrichment. *Mol Med Rep* 14, 2231–2237.

Zhang, Y., Matthiesen, P., Harder, S., Siebert, R., Castoldi, G., Calasanz, M.J., Wong, K.F., Rosenwald, A., Ott, G., Atkin, N.B., et al. (2000). A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 52–58.

Zhao, D., Kuhnt-Moore, S., Zeng, H., Wu, J.S., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2003).

Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 284, C1397-1404.

Zhao, D., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H.W., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2007). Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *Int. J. Cancer* 120, 1652–1656.

Zhao, D., Bakirtzi, K., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H.W., and Pothoulakis, C. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor transactivation modulates the inflammatory and proliferative responses of neurotensin in human colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 6092–6099.

Zhao, H., Zhang, X., Chen, X., Li, Y., Ke, Z., Tang, T., Chai, H., Guo, A.M., Chen, H., and Yang, J. (2014). Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6. *Toxicology and Applied Pharmacology* 279, 311–321.

Zhou, J., Yi, L., Ouyang, Q., Xu, L., Cui, H., and Xu, M. (2014). Neurotensin signaling regulates stem-like traits of glioblastoma stem cells through activation of IL-8/CXCR1/STAT3 pathway. *Cell. Signal.* 26, 2896–2902.

## **Annexe 1 : Review « Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes »**

---

En parallèle des travaux présentés précédemment, une revue bibliographique traitant des différentes fonctions de la sortiline et de SorLA dans les processus immunitaires a été rédigée.

Cette revue intitulée « Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes », a été soumise au journal *Frontiers in Pharmacology*, section *Experimental Pharmacology and Drug Discovery* dans le cadre d'un « Research Topic » dont le sujet est le suivant : *Sortilin and Sortilin Partners in Physiology and Pathologies*. Cette revue a été acceptée pour publication.

# 1 **Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes**

2

3 **Hugo Talbot<sup>1\*</sup>, Sofiane Saada<sup>1</sup>, Thomas Naves<sup>1</sup>, Paul-François Gallet<sup>1</sup>, Anne-Laure Fauchais<sup>1,2</sup>,**  
4 **Marie-Odile Jauberteau<sup>1,3\*</sup>**

5

6 <sup>1</sup> Limoges University, Equipe Accueil 3842, Faculty of Medicine, Limoges Cedex, France

7 <sup>2</sup> Department of Internal Medicine, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges  
8 Cedex, France

9 <sup>3</sup> Department of Immunology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex,  
10 France

## 11 **\* Correspondence:**

12 Hugo Talbot

13 hugo.talbot@unilim.fr

Marie-Odile Jauberteau

m-o.jauberteau-marchan@unilim.fr

14 **Keywords: Sortilin, SorLA, immune system, cytokines, trafficking, signaling, inflammation,**  
15 **phagocytosis**

## 16 **Abstract**

17 Sortilin, also known as Neurotensin Receptor-3, and the sorting-related receptor with type-A repeats  
18 (SorLA) are both members of the Vps10p domain receptor family. Initially identified in CNS cells,  
19 they are expressed in various other cell types where they exert multiple functions. Although mostly  
20 studied for its involvement in Alzheimer's disease, SorLA has recently been shown to be implicated  
21 in immune response by regulating IL-6-mediated signaling, as well as driving monocyte migration.  
22 Sortilin has been shown to act as a receptor, as a co-receptor and as an intra- and extracellular  
23 trafficking regulator. In the last two decades, deregulation of sortilin has been demonstrated to be  
24 involved in many human pathophysiologicals, including neurodegenerative disorders (Alzheimer and  
25 Parkinson diseases), type 2 diabetes and obesity, cancer, and cardiovascular pathologies such as  
26 atherosclerosis. Several studies highlighted different functions of sortilin in the immune system,  
27 notably in microglia, pro-inflammatory cytokine regulation, phagosome fusion and pathogen  
28 clearance. In this review, we will analyze the multiple roles of sortilin and SorLA in the human  
29 immune system and how their deregulation may be involved in disease development.

30

## 31 **Introduction**

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

32 The vacuolar protein sorting 10 protein (Vps10p) domain receptors family is composed of five  
33 members: sortilin, SorLA, sorCS1, sorCS2 and sorCS3. In adult human, Vps10p receptors expression  
34 was primarily shown in the brain but has also been detected in various other tissues and organs  
35 (Hermey, 2009). They also have a dynamic and transient expression during embryonic and post-natal  
36 development in rodents, mainly in the nervous system (Hermans-Borgmeyer et al., 1999). Moreover,  
37 sortilin is highly expressed in embryonic lung, and SorLA in embryonic lung, kidney and developing  
38 glands (Hermey, 2009). These observations suggest specific functions of sortilin and SorLA in the  
39 developing organs.

40 Since the discovery in the 1990's of sortilin (Mazella et al., 1998; Petersen et al., 1997) and SorLA  
41 (Jacobsen et al., 1996), these two proteins have been extensively studied for their functions as  
42 regulators of intracellular trafficking through their Vps10p domain. Vps10p is an extracellular ligand  
43 binding domain of 700 amino acids folded in a ten-bladed  $\beta$ -propeller (Kitago et al., 2015;  
44 Quistgaard et al., 2009). Vps10 domain proteins (Figure 1A) are subjected to various trafficking  
45 paths (Figure 1B): i) transport from the Trans-Golgi Network (TGN) to the plasma membrane where  
46 they can act as receptors, or be shedded by metalloproteases and  $\gamma$ -secretases to finally be released as  
47 soluble proteins (Evans et al., 2011; Hermey et al., 2006; Nyborg et al., 2006; Ohwaki et al., 2007);  
48 ii) clathrin-dependent internalization from the plasma membrane to endosomes (Morinville et al.,  
49 2004; Nielsen et al., 2001) and then either to the TGN through the retromer complex (Mari Muriel et  
50 al., 2007; Seaman, 2007) or to lysosomes for degradation (Dumanis et al., 2015; Tanimoto et al.,  
51 2017); iii) finally they can be exported from the TGN to the extracellular medium through secretory  
52 granules (Yang et al., 2011) or extracellular vesicles such as exosomes (Wilson et al., 2014a).

53 Both sortilin and SorLA have a wide variety of ligands and can either act as sorting regulators or  
54 receptors/co-receptors for cell signaling. Therefore, they are involved in many processes depending  
55 on cell type, as well as in many associated cellular disorders. Sortilin and SorLA are both involved in  
56 neurotensin (NTS) (Jacobsen et al., 2001; Mazella, 2001; Mazella et al., 1998) and neurotrophins  
57 signaling (Larsen et al., 2010, 2016; Nykjaer et al., 2004; Rohe et al., 2009, 2013; Teng et al., 2005).  
58 They are implicated in Alzheimer's disease development since sortilin interacts with apoE (Carlo et  
59 al., 2013) and SorLA regulates amyloid precursor protein and amyloid- $\beta$  peptides sorting (Andersen  
60 et al., 2005; Offe et al., 2006). Sortilin also regulates glucose transporter (Glut-4) sorting (Pan et al.,  
61 2017). Moreover, SorLA has been described as a risk factor for obesity (Schmidt et al., 2016; Whittle  
62 et al., 2015). Both proteins are involved in cardiovascular and metabolic diseases, such as  
63 atherosclerosis and type-2 diabetes, because of their lipoproteins regulatory functions (reviewed in

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

64 (Schmidt and Willnow, 2016). Finally, sortilin has been shown to be implicated in the development  
65 of different cancers (Wilson et al., 2016).

66 Few studies showed the expression of sortilin and SorLA and their potential functions in lymphoid  
67 tissues and bone marrow (BM). Sortilin is expressed in T and B lymphocytes, dendritic cells, NK  
68 cells, macrophages and microglia (Fauchais et al., 2008; Herda et al., 2012; Martin et al., 2003;  
69 Yabe-Wada et al., 2016) and SorLA expression was detected in monocytes, T and B cells and  
70 hematopoietic precursors (Sakai et al., 2012; Zhang et al., 2000). Here, we reviewed their  
71 involvement in immune-related processes, their known protein partners during these processes, and  
72 the pathologies associated with their deregulation.

### 73 **1 Sortilin, SorLA and inflammation**

74 Inflammation is the organism's response to harmful stimuli. Upon exposure of tissues and organs to  
75 pathogens or toxic products, both innate and adaptive immune responses are activated at the  
76 inflammatory site. Main inflammation actors are innate and adaptive immune cells (macrophages,  
77 monocytes, dendritic cells, T-cells, B-cells...) which are recruited to the inflammatory site via pro-  
78 inflammatory chemokines. Inflammation mechanisms are controlled by pro-inflammatory cytokines,  
79 inducing complex intracellular signaling pathways. These cytokines are mainly interleukin (IL)-1, IL-  
80 6, IL-17, TNF- $\alpha$  and types I, II and III interferon (IFN). Disruption of these factors may lead to auto-  
81 inflammatory and pro-inflammatory disorders (Turner et al., 2014).

#### 82 **1.1 Sortilin, SorLA and pro-inflammatory cytokines**

##### 83 **1.1.1 Sortilin regulates pro-inflammatory cytokines exocytosis and signaling**

84 Recent studies have highlighted the involvement of sortilin in the regulation of cytokines secretion  
85 during different immune functions, related to cell cytotoxicity and inflammation, through the control  
86 of IFN- $\gamma$  and IL-6 exocytosis.

87 These functions were deduced from experimental models of *Sort1* knock-out (*sort1*<sup>-/-</sup>) C57BL/6 mice.  
88 In natural killer cells (NK) and cytotoxic T lymphocytes (CTL), sortilin deficiency impaired the  
89 endosomal trafficking of cytolytic vesicles containing granzyme A. An upregulation of vesicle-  
90 associated membrane protein 7 (VAMP7), a late endosomal trafficking regulator, was observed due  
91 to its diminished lysosomal degradation. This was associated with the increase of granzyme A release  
92 and cytotoxic activity of CTL and NK cells (Herda et al., 2012). In this model, IFN- $\gamma$  retention was  
93 detected in the Golgi network of CTLs, NKs and Th1 cells. Indeed, sortilin interacts with IFN- $\gamma$  in  
94 early endosomes sorting platforms at the TGN-toward different vesicle compartments: recycling

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

95 endosomes, late endosomes or secretory lysosomes. The consequences of sortilin inactivation are  
96 demonstrated both during bacterial infection leading to a decreased IFN- $\gamma$  release and in experimental  
97 autoimmune colitis reducing inflammatory lesions. In these models, TNF- $\alpha$  secretion was not  
98 modified and remains independent from sortilin binding and trafficking. Hence, through the  
99 regulation of both granzyme A and IFN- $\gamma$  release, sortilin regulates the immune functions of T  
100 lymphocytes and NK cells during adaptive immune responses and target cell killing. (Herda et al.,  
101 2012).

102 In addition to INF- $\gamma$ , sortilin binding to IL-6 was demonstrated in LPS-activated type 1 macrophages  
103 (M1). This interaction depends on its extracellular domain and occurs intracellularly to regulate their  
104 secretion (Mortensen et al., 2014). IL-6 and IFN- $\gamma$  effects are synergistic since IL-6 stimulates Th1  
105 activation and IFN- $\gamma$  secretion, and IFN- $\gamma$  promotes IL-6 production by macrophages. In a C57BL/6  
106 mouse model of atherosclerosis, the absence of sortilin induced a defect of IL-6 and IFN- $\gamma$  secretion  
107 in activated macrophages and Th1 cells, reducing the inflammatory component of vascular lesions  
108 and atherosclerosis, independently of sortilin effect on lipid metabolism. Hence, by directly  
109 regulating IFN- $\gamma$  and IL-6 secretion, sortilin could be a key regulator of inflammatory response  
110 increasing inflammatory component of atherosclerosis (Mortensen et al., 2014). Its deregulation in  
111 other inflammatory diseases needs to be investigated.

112 Beside IFN- $\gamma$  and IL-6, surface plasmon resonance analysis demonstrated that sortilin also binds to  
113 other cytokines IFN- $\alpha$ , IL-17A, IL-10 and IL-12 (Yabe-Wada et al., 2016). The functions of sortilin  
114 in the exocytic trafficking of IFN- $\alpha$  was demonstrated in plasmacytoid dendritic cells (pDCs),  
115 known to secrete IFN- $\alpha$  (Yabe-Wada et al., 2016). This IFN trafficking depends on the dimerization  
116 of the sortilin ectodomain in acidic pH conditions encountered in the RE and TGN (Yabe-Wada et  
117 al., 2018). Through TLR9 activation, IFN- $\alpha$  release depends on sortilin and is diminished in sortilin-  
118 inactivated pDCs, without affecting its RNA transcription. However, a sustained TLR9 activation  
119 induces a subsequent negative control of IFN- $\alpha$  release depending on a post transcriptional  
120 degradation of sortilin, induced by TLR activation. Given the importance of IFN- $\alpha$  in antiviral  
121 immunity or in certain autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, it would be  
122 interesting to further study the role of sortilin in the regulation of type I IFN secretion in these related  
123 disorders.

124 In addition to the regulation of cytokine exocytosis, sortilin also regulates their signaling as reported  
125 for ciliary neurotrophic factor (CNTF) belonging to IL-6 family of cytokines sharing a common  
126 gp130 subunit receptor. This family includes IL-6, IL-11, IL-27, leukemia inhibitory factor (LIF),



## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

127 oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like  
128 cytokine (CLC), neuropoietin (NP) and IL-31 (Scheller et al., 2011). CNTF activation depends on its  
129 binding to the receptor CNTFR $\alpha$ , followed by the recruitment of the heterodimeric complex  
130 gp130/LIFR $\beta$  receptor, leading to Janus Kinase (JAK) and STAT3 activation/phosphorylation.  
131 Sortilin binds the C-terminus tail of CNTF with a high affinity, at a distinct site of CNTFR $\alpha$  binding,  
132 and mediates rapid uptake and clearance of extracellular CNTF. Sortilin also interacts with LIFR $\beta$ ,  
133 and thus facilitates CNTF signaling through the heterodimer gp130/LIFR $\beta$  regardless of CNTF or  
134 CNTFR $\alpha$  binding to sortilin (Figure 2A). Similar interactions of CLC:CLF-1 with sortilin have been  
135 observed. However, its implication in endocytosis and/or secretion process of the cytokine remains  
136 unknown. According to the direct interaction of sortilin with LIFR $\beta$  subunit, it is worth noting that  
137 sortilin facilitates cytokine signaling depending on the LIFR $\beta$  subunit receptor. This concerns  
138 cytokines CT-1, LIF, OSM that engage the gp130/LIFR $\beta$  complex, but not IL-6 which engages the  
139 homodimer gp130 (Larsen et al., 2010). Thus sortilin is a key regulator of gp130/LIFR $\beta$ -IL-6 family  
140 in both physiological and pathophysiological processes, such as B-cell stimulation, the control of  
141 regulatory and effector T cells balance, metabolic functions, neural functions or autoimmune diseases  
142 (extensively reviewed in Rose-John, 2018). Further studies may highlight an important role of  
143 sortilin in the modulation of cell signaling induced by this pleiotropic cytokine family.

### 144 1.1.2 SorLA regulates CLF-1 and IL-6 signaling

145 Like sortilin, SorLA is implicated into the regulation of IL-6 family signaling as reported in a pro-B  
146 lymphocytes murine cell line. Whereas CLC and CLF-1 have a binding site for CNTFR $\alpha$ , only CLF-  
147 1 displays a binding site for SorLA. Thus, SorLA interacts either with CLF-1 alone, or with the  
148 cytokine CLC:CLF-1 complex via CLF-1 binding as well as with the heterotrimer of CLC:CLF-1  
149 associated with CNTFR $\alpha$ . According to its partners, different functions of SorLA were described  
150 (Figure 2B). If the trimer is anchored to the membrane through membranous CNTFR $\alpha$ , SorLA  
151 mediates the internalization and lysosomal degradation of the complex and thus downregulates  
152 CLC:CLF-1/CNTFR $\alpha$  signaling. On the other hand, if the formed complex includes the soluble form  
153 of CNTFR $\alpha$ , SorLA concentrates the complex at the membrane, enhances its interaction with  
154 gp130/LIFR $\beta$  and thus increases JAK/STAT signaling. So, through interaction with CLF-1 only,  
155 SorLA regulates CLC/CNTFR $\alpha$  signaling and turnover (Larsen et al., 2016). SorLA additionally  
156 regulates IL-6 signaling (Figure 2C). IL-6 can induce signaling pathways, namely *cis* signaling when  
157 it binds to membrane-bound IL-6 Receptor (IL-6R) and *trans* signaling when binding the soluble  
158 form of IL-6R (sIL-6R). The complex formed then engages homodimeric gp130 to induce signaling

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

159 via the JAK/STAT pathway. SorLA binds by its Vps10p domain both IL-6 and IL-6R independently  
160 or in complex. When interacting with IL-6 or sIL-6R, SorLA mediates cellular uptake and  
161 endocytosis of both proteins. Membrane-bound IL-6R has also been found to interact with SorLA. In  
162 such cases, SorLA downregulates *cis* signaling, probably by inhibiting IL-6 binding on IL-6R. The  
163 soluble form of SorLA can interact with circulating IL-6, in this complex SorLA acts as a stabilizing  
164 carrier protein, increasing IL-6 functional half-life and thus enhancing IL-6 *trans* signaling (Larsen  
165 and Petersen, 2017).

166 Larsen and colleagues highlight in this study a potentially crucial role of SorLA in regulation of IL-6  
167 cytokine family signaling. Once again, the IL-6 family of cytokines is involved in many  
168 physiological and pathophysiological processes including, but not limited to, immune response and  
169 hepatic acute phase reaction (Rose-John, 2018). Uncovering the role of SorLA in modulation of IL-6  
170 family signaling, could further deepen our understanding of these processes. For example, CLF-1 can  
171 interact with p28, a subunit of IL-27, to form a cytokine complex activating NK and T cells in the  
172 presence of IL-6R $\alpha$  (Crabé et al., 2009) and a potential involvement of sortilin or SorLA in this  
173 pathway should be investigated given their role in CLF-1 signaling (Larsen et al., 2010, 2016).

174

### 175 1.1.3 Inflammatory conditions regulate sortilin expression

176 We mentioned previously that sortilin might be a key regulator of pro-inflammatory cytokines. Upon  
177 viral infection, viruses are sensed by Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 on pDCs, leading to massive  
178 secretion of IFN- $\alpha$ , under the control of sortilin (Yabe-Wada et al., 2016). In the same time, TLR  
179 signaling, in response to inflammatory conditions, negatively regulates sortilin expression which  
180 impairs IFN- $\alpha$  secretion. Similar findings were observed in adipocytes. Under inflammatory  
181 conditions and increase of TNF- $\alpha$  levels, a diminution of both sortilin mRNA and protein were  
182 detected (Hivelin et al., 2017; Kaddai et al., 2009), by an unknown mechanism. Recently, several  
183 mechanisms are described and correlated with the regulation of sortilin expression, depending on  
184 different transcriptional and post transcriptional regulating factors (Sung et al., 2018).

185 Some mechanisms regulating sortilin expression are linked to transcriptional regulation of *SORTI*  
186 gene by different transcriptional factors. In an anti-inflammatory mice model depleted of regulatory  
187 T cells (Treg), IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels are increased, notably in the liver, in parallel to a local  
188 inflammation (Klingenberg et al., 2013). IFN- $\gamma$  activation decreased *SORTI* transcription and sortilin  
189 expression in hepatocytes, through the activation of the JAK/STAT1 pathway and the binding of P-  
190 STAT1 to the promoter of sortilin (Pirault et al., 2017).

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

191 Another transcriptional regulation of *SORT1* implicates the activating transcription factor 3 (ATF3),  
192 a transcriptional repressor and regulator of inflammation pathway. ATF3 is a member of the cyclic  
193 adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein (CREB), containing a DNA  
194 binding region and a bZIP domain (Chen et al., 1994; Hai and Hartman, 2001; Liang et al., 1996)  
195 ATF3 homodimerization represses transcription, but conversely, its heterodimerization with Jun  
196 proteins activates transcription (Liang et al., 1996). ATF3 promoter possesses many binding sites of  
197 transcription factors such as ATF/CRE (C-rich element), activator protein 1 (AP1) and NF- $\kappa$ B,  
198 suggesting that its expression is regulated by stress conditions like pro-inflammatory environment  
199 (Hai et al., 1999; Hashimoto et al., 2002). Under stress or pathogenic conditions, TLRs stimulation  
200 induces NF- $\kappa$ B activation and ATF3 transcription. ATF3 has been shown to downregulate pro-  
201 inflammatory cytokines transcription, notably of IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$   
202 as well as chemokines CCL1, CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, and CCL11 (Boespflug et al.,  
203 2014; Gilchrist et al., 2006; Hoetzenecker et al., 2012; Khuu et al., 2007; Lai et al., 2013;  
204 Rosenberger et al., 2008; Zheng and Abraham, 2013). On the other hand, ATF3 expression is also  
205 induced by feedback regulation of some of these cytokines, including IL-6, IFN- $\gamma$  and IFN- $\beta$  (Hai et  
206 al., 1999; Ho et al., 2008; Labzin et al., 2015). These results highlight ATF3 role in the modulation of  
207 host immune response under stress or physiopathological conditions (Jadhav and Zhang, 2017).  
208 ATF3 binding to the proximal promoter region of *SORT1* represses *SORT1* transcription (Ai et al.,  
209 2012). In hepatocytes, endoplasmic reticulum stress induces an increase of ATF3 and thus a  
210 reduction of sortilin expression, leading to reduced VLDL clearance and promoting atherosclerosis  
211 (Ai et al., 2012; Klingenberg et al., 2013). In parallel, the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  –induced drop of sortilin  
212 expression are both associated with an increase in ATF3 expression.  
213 We hypothesize that regulation of sortilin expression by ATF3 might be of major importance in  
214 immunomodulation. Indeed, ATF3 regulates the expression of various pro-inflammatory cytokines  
215 and chemokines, and is itself regulated by them. On the other hand, sortilin can modulate the  
216 production and secretion of some of those cytokines and is also regulated by them. We believe that a  
217 balance between ATF3 and sortilin expression might be of great importance in the modulation of  
218 inflammation and immune response. Sortilin promotes inflammation and consequently activates an  
219 autoregulation loop by ATF3 activation, although only few studies, all focused on atherosclerosis,  
220 confirmed the important role of sortilin/ATF3 axis in innate immunity. These observations should be  
221 more deeply investigated especially its potential deregulation in chronic inflammatory diseases.  
222 Moreover, another post transcriptional mechanism controlling sortilin expression was detected under  
223 TLR activation. It concerns its mRNA stability depending on CRE, identified in the 3'UTR of

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

224 sortilin mRNA. Under physiological conditions, poly-rC binding protein 1 (PCBP1), a protein  
225 involved in RNA processing, translation and stability (Makeyev and Liebhaber, 2002), binds to CRE  
226 and improves sortilin mRNA stability. TLR signaling activation by viral infection induces an  
227 increase in intracellular metal zinc, which in turn leads to PCBP1/CRE dissociation in the 3' UTR of  
228 sortilin mRNA, and finally its degradation. This posttranscriptional regulation of sortilin by TLR  
229 results in decrease of sortilin protein level and thus activity, and consequently a decrease in pro-  
230 inflammatory cytokines production (Yabe-Wada et al., 2016).

231

### 232 1.2 Sortilin, SorLA and atherosclerosis

#### 233 1.2.1 Sortilin regulates inflammation in atherosclerosis

234 Sortilin has been identified as an important regulator of cardiovascular and metabolic disorders.  
235 Among them, sortilin is implicated in atherosclerosis and atherosclerotic plaques development  
236 through multiple processes, including regulation of calcification (Goettsch et al., 2016), lipoprotein  
237 metabolism (Kjolby et al., 2010; Strong et al., 2012), Glut4 biogenesis and glucose uptake in type-2  
238 diabetes (Shi and Kandror, 2005) and arterial wall inflammation (Mortensen et al., 2014; Patel et al.,  
239 2015). In this review we will only discuss the relationship between sortilin and the immune system in  
240 atherosclerosis (more details on the implication of sortilin in atherosclerosis can be found in recent  
241 reviews (Goettsch et al., 2018; Schmidt and Willnow, 2016; Zhong et al., 2016).

242 Sortilin is expressed by immune cells, notably macrophages and Th1 cells. In macrophages, sortilin  
243 promotes native LDL uptake, leading to the formation of cholesterol-loaded macrophages called  
244 foam cells (Patel et al., 2015), implicated in atherosclerosis development (Yu et al., 2013). As  
245 described above, sortilin plays an important role in pro-inflammatory cytokines secretion, such as IL-  
246 6 in macrophages and IFN- $\gamma$  in Th1 cells (Mortensen et al., 2014). IL-6 facilitates the secretion of  
247 IFN- $\gamma$  by T cells (Nurieva et al., 2007). Both cytokines have been associated to atherosclerosis  
248 promotion (Koga et al., 2007; Schuett et al., 2012). Surprisingly, pro-inflammatory cytokine  
249 regulation in macrophages described by Mortensen et al., in their *sort1*<sup>-/-</sup> mouse model was not  
250 confirmed by Patel et al., despite a reduction in atherosclerosis lesions.

251 Correlating with previously discussed results on T Reg (FOXP3+)-depleted mice (mimicking  
252 hyperinflammation), the increase of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  downregulates sortilin expression in the liver.  
253 This model was marked by extensive atherosclerosis lesions with vascular inflammation. These  
254 results are associated with reduced VLDL and chylomicron clearance and augmented plasmatic  
255 cholesterol levels, which promote atherosclerosis. They demonstrate that immunity could regulate

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

256 sortilin-mediated metabolic processes and that chronic inflammation might also promote metabolic  
257 disorders and cardiovascular diseases (Klingenberg et al., 2013).

258 Although very few studies investigated the immunomodulatory role of sortilin in atherosclerosis, we  
259 can hypothesize that sortilin promotes formation of foam cells and chronic inflammation in blood  
260 vessels inducing atherosclerosis development. This chronic inflammation might in turn downregulate  
261 sortilin in the liver and disrupt lipoprotein metabolism, further enhancing atherosclerosis and  
262 cardiovascular diseases. Given the small number of studies, some results remain conflicting and need  
263 further investigation and clarification.

264

### 265 **1.2.2 SorLA modulates monocyte migration to atherosclerotic lesions**

266 Following vascular injury, circulating monocytes infiltrate the intima and differentiate into  
267 macrophages. Those macrophages secrete chemoattractant molecules enhancing inflammatory cells  
268 recruitment. One of them, MCP-1 (CCL-2) plays a crucial role in monocyte recruitment and  
269 activation. Moreover, an increase of MCP-1 expression has been detected in atheromatous plaques  
270 (Charo and Taubman, 2004; Lusis, 2000; McCarthy et al., 2010; Schmidt et al., 2017). Conjugated  
271 Linoleic Acids (CLA) were identified as atheroprotective by inhibiting inflammatory cytokines  
272 (Changhua et al., 2005; Yu et al.), including MCP-1 secretion and thus monocyte migration, as well  
273 as inflammatory phenotypes of activated macrophages (McClelland et al., 2010).

274

275 In atherosclerotic tissues, SorLA is overexpressed in monocytes/macrophages, and CLA inhibits its  
276 expression through a PPAR- $\gamma$ -dependent pathway and a decrease of SorLA, reducing migration of  
277 monocytes to MCP-1 stimuli. Furthermore, an increase in SorLA was followed by an increase in  
278 urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (uPAR) known to be involved in the infiltration of  
279 intima by monocytes cells and in foam cells formation (Gu et al., 2005; May et al., 2002; McCarthy  
280 et al., 2010). Soluble form of SorLA, highly increased in atheromatous plaques, activates uPAR  
281 expressed at the cell surface, promoting migration of macrophages and lipids accumulation (Ohwaki  
282 et al., 2007).

283 In atherosclerosis, SorLA exerts a dual role: it is implicated in the regulation of lipolysis (Klinger et  
284 al., 2011; Mendoza-Barberá et al., 2013; Nilsson et al., 2007, 2008; Schmidt et al., 2017) and in the  
285 regulation of monocyte migration to MCP-1 stimuli. Although these processes were only described in  
286 atherosclerosis cases, it would be interesting to study SorLA implication in monocyte/macrophage  
287 migration in physiological immune process such as inflammation following antigens stimuli. Hence,

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

288 uPAR, known as an important player in tissue repair process (Blasi and Carmeliet, 2002), may also  
289 implicate SorLA.

290

### 291 1.3 Sortilin, microglia and neuroinflammation

292 Microglia cells, tissue-based macrophages of the Central Nervous System (CNS), are considered as  
293 the key innate immunity cells in the CNS (Gehrmann et al., 1995; Kofler and Wiley, 2011). They  
294 have a sentinel immune function, constantly surveying their environment to detect tissue damage and  
295 pathogens. As most tissue macrophages, they recognize damage-associated molecular patterns  
296 (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by high expression of surface  
297 receptors such as TLRs, CD68 or CD206, as well as cytoplasmic receptors such as retinoic acid-  
298 inducible gene-1-like (RLR) and nuclear oligomerization domain-like receptors (NLR). TLRs  
299 signaling results in activation of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-18, gene  
300 transcription and pro-protein synthesis, while RLR or NLR induces formation of an inflammasome  
301 (Aravalli et al., 2007; Lehnardt, 2010; Ross, 2010).

302 Murine and human microglia cells express sortilin but not the two other NTS receptors NTSR1 and  
303 NTSR2 (Martin et al., 2003; Patel et al., 2016). Upon stimulation by NTS, sortilin activates both  
304 PI3K/AKT and MAPK/ERK1-2 pathways. These signaling pathways induce an increase in pro-  
305 inflammatory cytokines and chemokines transcription, including Monocyte Chemoattractant Protein-  
306 1 (MCP-1), MIP-2 (or CXCL2), IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , responsible for inflammatory processes and  
307 leucocytes recruitment (Dicou et al., 2004). Upon stimulation by NTS, sortilin induces the migration  
308 of murine microglial cells through chemoattractive effects and induces their maturation into pro-  
309 inflammatory cytokines producing phagocytes which might contribute to neuroinflammation and  
310 development of neurodegenerative disorders (Dicou et al., 2004; Martin et al., 2003, 2005). In human  
311 microglia, a similar activation is obtained *in vitro* by NTS, inducing production of pro-inflammatory  
312 cytokines IL-1 $\beta$ , CXCL8, CCL2 and CCL5 through PI3K/mTOR activation. These signaling effects  
313 were inhibited by mTOR inhibitors such as methoxyluteolin (Patel et al., 2016). A relationship with  
314 autism is hypothesized based on the increase in plasmatic NTS levels, evidenced in children with  
315 autism spectrum disorders, notably with the accompanying gastrointestinal dysfunction. There is an  
316 hypothesized link between such results, neuroinflammation, and the interaction of microglia and  
317 microbiome disorders (recently reviewed in Lebovitz et al., 2018), but the mechanisms have yet to be  
318 determined.

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

319 Sortilin can also regulate brain inflammation by mediating progranulin (PGRN) uptake by microglial  
320 cells. PGRN is a growth factor implicated in the regulation of various processes, including wound  
321 healing, tumorigenesis and inflammation (recently reviewed in Paushter et al., 2018). PGRN is  
322 produced and secreted at high levels by microglia, especially by trauma activated cells, and  
323 associated to anti-inflammatory effects by controlling microglial activation, migration, phagocytosis  
324 and synapse pruning (Paushter et al., 2018). PGRN could potentially bind to TNFR, inhibiting  
325 inflammatory effects by competing with TNF- $\alpha$  (Tang et al., 2011). Sortilin in microglia is able to  
326 bind extracellular PGRN and mediate its endocytosis and clearance, thus reducing anti-inflammatory  
327 properties (Chen et al., 2013; Jian et al., 2013; Kumar-Singh, 2011). PGRN deficiency causes several  
328 neurodegenerative pathologies; PGRN haploinsufficiency is associated with frontotemporal dementia  
329 and a total deficiency can cause neuronal ceroid lipofuscinosis. Gene therapies recovering PGRN  
330 expression have beneficial effects on the patients affected with frontotemporal dementia or neuronal  
331 ceroid lipofuscinosis, and a combined inhibition of sortilin in microglia could reduce PGRN  
332 clearance, increasing extracellular PGRN concentration and potentially enhancing its beneficial  
333 effects (Arrant et al., 2018).

334 As microglia are activated via sortilin, its involvement in the development of Multiple Sclerosis has  
335 been studied through a model of experimental-induced encephalomyelitis in *sort1*<sup>-/-</sup> mice. Whereas  
336 sortilin is expressed in mouse microglia and dendritic cells, its loss reduced the antigen-processing  
337 ability in dendritic cells but did not affect the development and progression of brain lesions,  
338 suggesting that sortilin did not control this autoimmune encephalitis (Reuter et al., 2015). This  
339 discrepancy with the models previously described may be related to the acute experimental model  
340 and that sortilin regulatory functions are more relevant in chronic inflammatory models.

341

### 342 1.4 Sortilin, inflammation and cancer?

343 To further expand on the implication of sortilin in inflammatory context, we open perspectives on  
344 cancer-mediated inflammation. As previously discussed, while sortilin deregulation were well  
345 characterized in neurodegenerative and cardiovascular diseases (Schmidt and Willnow, 2016; Wilson  
346 et al., 2014b), the involvement of sortilin in cancer cells homeostasis remains misunderstood and  
347 subject to controversies. Indeed, sortilin participates actively in the release of growth factors  
348 promoting thereby autocrine survival loops through “sustained proliferative signaling”, a central  
349 hallmark of cancer. Inversely, a cell suicide may triggers following the association of the sortilin with  
350 the death domain receptor p75, alimenter thus controversies toward sortilin. Surprisingly, while

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

351 sortilin regulates the immune functions of T lymphocytes and NK cells, no data are stated whether  
352 sort1<sup>-/-</sup> mice develop spontaneous tumors. Likewise, no clinical data stated about the expression of  
353 sortilin in tumor-infiltrating immune cells. Intriguingly, while immune surveillance remains a crucial  
354 barrier against transformed cells, immune cells play an important role in tumor initiation,  
355 progression, and invasion. Indeed, pre-neoplastic lesions trigger pro-inflammatory cells recruitment  
356 and infiltration. For example, gastric cancer cells express both IL-6 and its receptor and may illustrate  
357 an indirect role of sortilin mediated pre-metastasis niche formation. Indeed, infiltrated-inflammatory  
358 cells release IL-6 upon the dependence of sortilin. Exogenous IL-6 promotes the proliferation and the  
359 invasion of gastric cells as well as the secretion of the vascular endothelial growth factor C (VEGFR-  
360 C) promoting lymphatic drainage. Thus, the release of IL-6 toward neoplastic lesion promotes  
361 lymphangiogenesis, a first step before lymph node invasion (Zhao et al., 2016). Interestingly, sortilin  
362 expression is correlated with breast cancer aggressiveness and lymph node metastasis (Roselli et al.,  
363 2015). Interestingly, sortilin is also involved in the release of progranulin by breast cancer cells,  
364 inducing migration and cancer stem cell expansion (Rhost et al., 2018). However, no data stated  
365 about the expression of sortilin in infiltrated-inflammatory cells as well as the implication of sortilin  
366 in the release of IL-6 from cancer cells.

367 In conjunction with IL-6, IFN $\gamma$  plays a major role in modulation of the cancer immune network to  
368 inhibit or promote tumor progression (Landskron et al., 2014; Mojic et al., 2017; Shalpour and  
369 Karin, 2015). Through regulation of IFN- $\gamma$  and IL-6 cytokine family, we speculate that sortilin could  
370 be involved in tumor microenvironment inflammation and promote tumor progression.

371

## 372 **2 Sortilin and phagocytosis/scavenging**

### 373 **2.1 Sortilin mediates macrophage antigen scavenging**

374 Alternatively activated macrophages (AAM), M2-type macrophages, are obtained by stimulation of  
375 macrophages by Th2 lymphocytes producing anti-inflammatory cytokines such as TGF- $\beta$ , IL-4, IL-  
376 10, IL-13. These macrophages are characterized by an increase of innate immunity markers, class II  
377 MHC and CD14 expression, an increased phagocytic activity and a decreased antigen processing  
378 ability (Gordon, 2003; Martinez et al., 2008; Mosser and Edwards, 2008; Tzachanis et al., 2002).  
379 AAM showed augmented levels of known scavenger receptors Macrophage Mannose Receptor (or  
380 CD206) and sortilin expression. CD206 and sortilin might participate to the increased extracellular  
381 antigen scavenging. Associated with AAM inability to process scavenged antigens, this process



## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

382 participates in T cell response inhibition, which is essential for transplantation tolerance (Tzachanis  
383 et al., 2002). By regulating antigen clearance by macrophages, sortilin might be indirectly implicated  
384 in modulation of T cell mediated immunity and transplant rejection (Figure 3A).

385

### 386 **2.2 Sortilin regulates phagosome maturation and lysosomal enzyme delivery**

387 Fusion between the phagosome and the lysosome is a key event in mycobacteria elimination by  
388 macrophages. It allows phagolysosome formation, able to efficiently eradicate the infection. Upon  
389 infection by the non-pathogenic mycobacteria *Mycobacterium smegmatis*, macrophages activate the  
390 NF- $\kappa$ B pathway, inducing phagolysosome fusion and mycobacteria killing. NF- $\kappa$ B activation results  
391 in a *de novo* synthesis of both lysosomal enzymatic components and proteins involved in intracellular  
392 trafficking, including sortilin (Gutierrez et al., 2008). In macrophages, sortilin is located toward the  
393 Golgi apparatus and acquired by phagosomes after their internalization. Sortilin interacts with two  
394 lysosomal proteins, Acid Sphingomyelinase (ASM) and Prosaposin (PS), and is required for their  
395 delivery from the Golgi to the intracellular phagosomes containing bacteria (Wahe et al., 2010).  
396 Likewise, sortilin is required for the targeting of the lysosomal proteases cathepsin D and H (Canuel  
397 et al., 2008). Sortilin and ASM are acquired in phagosomes at the early stages of mycobacteria  
398 infection. Sortilin and phagosome interaction (and subsequent delivery of ASM) is dependent of both  
399 anterograde transport and the retromer complex. Anterograde transport is dependent on interaction of  
400 sortilin with GGA/AP-1 complex through the dileucine motif 829LL in the sortilin cytoplasmic tail,  
401 and retromer complex interaction is dependent on sortilin residues 787 to 792 (FLVHRY) and  
402 cysteine 783 palmitoylation, also in the sortilin cytoplasmic tail. Upon infection by *Mycobacterium*  
403 *bovis* or *tuberculosis*, lack of sortilin elicits an increase of bacteria replication in macrophages,  
404 increasing neutrophils lung infiltration and pathogenesis (Vázquez et al., 2016).

405 In conclusion, macrophages infection by mycobacteria triggers the NF- $\kappa$ B pathway stimulating  
406 sortilin and ASM *de novo* synthesis. Then, sortilin transports ASM from the TGN to phagosomes  
407 through interaction of its cytoplasmic tail with GGA/AP-1 and the retromer complex essential for  
408 anterograde and retrograde transport. Hence, in concert, both sortilin and ASM delivery are required  
409 for phagosome maturation, bacteria growth restriction and efficient elimination (Figure 3B).

410

411

412

413 **3 SorLA may be implicated in maintaining the hematological pool**

414 Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs) differentiation from immature quiescent self-  
415 renewable cells into mature and proliferating cells, is planned by crucial events such as their adhesion  
416 to bone marrow cells. The BM pool of HSPCs is regulated by modulation of various molecules under  
417 hypoxic conditions (Chow et al., 2001; Lévesque et al., 2010; Suda et al., 2011; Trumpp et al., 2010).  
418 Among them, uPAR has been identified as a regulator of HSPCs adhesion in osteoblastic niches as  
419 well as a regulator of HSPCs proliferation and marrow pool size (Tjwa et al., 2009).

420 High levels of SorLA have been observed in immature hematopoietic precursors both at the plasma  
421 membrane and in soluble form following proteolytic shedding (Hermeijer et al., 2006; Zhang et al.,  
422 2000). Under hypoxic conditions, intracellular and soluble SorLA levels are increased after HIF-1 $\alpha$   
423 binding on *SorLA* promoter. Both soluble SorLA and uPAR are upregulated by hypoxia in the BM  
424 niche. Soluble SorLA interacts with membrane bound uPAR in immature hematological cells and  
425 modulates its activity, enhancing HSPCs adhesion to BM stromal cells, maintaining thus a normal  
426 hematological cell pool size (Nishii et al., 2013).

427

428 **Conclusion and remarks**

429 Sortilin and SorLA play incredibly versatile functions depending on their “interactome”. Studies to  
430 date emphasize their roles in NTS and neurotrophin signaling pathways in cancer progression, and in  
431 cardiovascular, metabolic and neurodegenerative disease. In the present review, we highlighted some  
432 of their roles in the immune homeostasis (summarized in Figure 4). Sortilin regulates the production  
433 and exocytosis of pro-inflammatory cytokines and is in turn downregulated by them. Both sortilin  
434 and SorLA are implicated in the modulation of IL-6 family cytokines signaling and turnover, which  
435 could potentially be of major significance in IL-6-dependent immune processes. Sortilin also  
436 stimulates neuroinflammation through both pro-inflammatory cytokines release and PGRN clearance  
437 by microglia. Furthermore, ATF3 identified as a sortilin expression repressor, may thus have a key  
438 immunomodulatory effect by inhibiting inflammation. However, sortilin and SorLA are not only  
439 involved in inflammation. Indeed, sortilin is expressed by macrophages and is implicated in antigen  
440 clearance, probably impacting T cell immunity and graft tolerance, and is also required during the  
441 maturation stages of phagolysosomes formation in cases of infection by mycobacteria. Interestingly,  
442 SorLA seems to be important for the differentiation of hematological stem cells in the BM and the  
443 maintenance of a normal hematological pool size.

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

444 Taken together these observations suggest that sortilin and SorLA may be involved in innate  
445 immunity, through regulation of inflammation and phagocytosis, as well as in adaptive immunity by  
446 controlling immune cells maturation and modulating T and NK cells activation. For now, only few  
447 studies highlighted a role for sortilin and SorLA in normal and/or pathological immunity, however,  
448 deeper investigations might identify unknown news functions in immunomodulatory pathways.  
449

### 450 **Conflict of Interest**

451 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
452 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### 453 **Author Contributions**

454 HT wrote the original draft of the manuscript and created the figures, SS, TN, PFG, ALF and MOJ  
455 reviewed and edited the manuscript and supervised this work.

### 456 **Funding**

457 This work was supported and funded by grants from, FEDER (Fonds européen de développement  
458 régional), the Limousin regional council, La Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité  
459 Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation de la Recherche en  
460 Cancérologie) from Limoges.

### 461 **References**

- 462 Ai, D., Baez, J.M., Jiang, H., Conlon, D.M., Hernandez-Ono, A., Frank-Kamenetsky, M., Milstein,  
463 S., Fitzgerald, K., Murphy, A.J., Woo, C.W., et al. (2012). Activation of ER stress and mTORC1  
464 suppresses hepatic sortilin-1 levels in obese mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1677–1687.
- 465 Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A.F.,  
466 Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., et al. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor  
467 sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*  
468 *102*, 13461–13466.
- 469 Aravalli, R.N., Peterson, P.K., and Lokensgard, J.R. (2007). Toll-like receptors in defense and  
470 damage of the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune*  
471 *Pharmacol.* *2*, 297–312.
- 472 Arrant, A.E., Onyilo, V.C., Unger, D.E., and Roberson, E.D. (2018). Progranulin Gene Therapy  
473 Improves Lysosomal Dysfunction and Microglial Pathology Associated with Frontotemporal  
474 Dementia and Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *J. Neurosci.* *38*, 2341–2358.
- 475 Blasi, F., and Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell*  
476 *Biol.* *3*, 932–943.
- 477 Boespflug, N.D., Kumar, S., McAlees, J.W., Phelan, J.D., Grimes, H.L., Hoebe, K., Hai, T., Filippi,  
478 M.-D., and Karp, C.L. (2014). ATF3 is a novel regulator of mouse neutrophil migration. *Blood* *123*,  
479 2084–2093.
- 480 Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., and Morales, C.R. (2008). Sortilin mediates the lysosomal

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 481 targeting of cathepsins D and H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *373*, 292–297.
- 482 Carlo, A.-S., Gustafsen, C., Mastrobuoni, G., Nielsen, M.S., Burgert, T., Hartl, D., Rohe, M.,  
483 Nykjaer, A., Herz, J., Heeren, J., et al. (2013). The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major  
484 neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid- $\beta$  peptide in the brain. *J. Neurosci. Off.*  
485 *J. Soc. Neurosci.* *33*, 358–370.
- 486 Changhua, L., Jindong, Y., Defa, L., Lidan, Z., Shiyan, Q., and Jianjun, X. (2005). Conjugated  
487 linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned  
488 pigs challenged with lipopolysaccharide. *J. Nutr.* *135*, 239–244.
- 489 Charo, I.F., and Taubman, M.B. (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ.*  
490 *Res.* *95*, 858–866.
- 491 Chen, B.P., Liang, G., Whelan, J., and Hai, T. (1994). ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional  
492 repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* *269*, 15819–15826.
- 493 Chen, X., Chang, J., Deng, Q., Xu, J., Nguyen, T.A., Martens, L.H., Cenik, B., Taylor, G., Hudson,  
494 K.F., Chung, J., et al. (2013). Progranulin Does Not Bind Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors  
495 and Is Not a Direct Regulator of TNF-Dependent Signaling or Bioactivity in Immune or Neuronal  
496 Cells. *J. Neurosci.* *33*, 9202–9213.
- 497 Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001). Modeling pO<sub>2</sub>  
498 Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. II. Modified Kroghian Models.  
499 *Biophys. J.* *81*, 685–696.
- 500 Crabé, S., Guay-Giroux, A., Tormo, A.J., Duluc, D., Lissilaa, R., Guilhot, F., Mavoungou-  
501 Bigouagou, U., Lefouili, F., Cognet, I., Ferlin, W., et al. (2009). The IL-27 p28 Subunit Binds  
502 Cytokine-Like Factor 1 to Form a Cytokine Regulating NK and T Cell Activities Requiring IL-6R  
503 for Signaling. *J. Immunol.* *183*, 7692–7702.
- 504 Dicou, E., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2004). Neurotensin receptor-3/sortilin mediates  
505 neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J. Neurosci.*  
506 *Res.* *78*, 92–99.
- 507 Dumanis, S.B., Burgert, T., Caglayan, S., Füchtbauer, A., Füchtbauer, E.-M., Schmidt, V., and  
508 Willnow, T.E. (2015). Distinct Functions for Anterograde and Retrograde Sorting of SORLA in  
509 Amyloidogenic Processes in the Brain. *J. Neurosci.* *35*, 12703–12713.
- 510 Evans, S.F., Irmady, K., Ostrow, K., Kim, T., Nykjaer, A., Saftig, P., Blobel, C., and Hempstead,  
511 B.L. (2011). Neuronal Brain-derived Neurotrophic Factor Is Synthesized in Excess, with Levels  
512 Regulated by Sortilin-mediated Trafficking and Lysosomal Degradation. *J. Biol. Chem.* *286*, 29556–  
513 29567.
- 514 Fauchais, A.-L., Lalloue, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and  
515 Jauberteau, M.-O. (2008). Role of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor and Sortilin in B  
516 Cell Survival. *J. Immunol.* *181*, 3027–3038.
- 517 Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell  
518 of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *20*, 269–287.
- 519 Gilchrist, M., Thorsson, V., Li, B., Rust, A.G., Korb, M., Kennedy, K., Hai, T., Bolouri, H., and  
520 Aderem, A. (2006). Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like  
521 receptor 4. *Nature* *441*, 173–178.
- 522 Goettsch, C., Hutcheson, J.D., Aikawa, M., Iwata, H., Pham, T., Nykjaer, A., Kjolby, M., Rogers,  
523 M., Michel, T., Shibasaki, M., et al. (2016). Sortilin mediates vascular calcification via its

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 524 recruitment into extracellular vesicles. *J. Clin. Invest.* *126*, 1323–1336.
- 525 Goettsch, C., Kjolby, M., and Aikawa, E. (2018). Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular  
526 and Metabolic Diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *38*, 19–25.
- 527 Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 23–35.
- 528 Gu, J.-M., Johns, A., Morser, J., Dole, W.P., Greaves, D.R., and Deng, G.G. (2005). Urokinase  
529 plasminogen activator receptor promotes macrophage infiltration into the vascular wall of ApoE  
530 deficient mice. *J. Cell. Physiol.* *204*, 73–82.
- 531 Gutierrez, M.G., Mishra, B.B., Jordao, L., Elliott, E., Anes, E., and Griffiths, G. (2008). NF- B  
532 Activation Controls Phagolysosome Fusion-Mediated Killing of Mycobacteria by Macrophages. *J.*  
533 *Immunol.* *181*, 2651–2663.
- 534 Hai, T., and Hartman, M.G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating  
535 transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating  
536 transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* *273*, 1–11.
- 537 Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E., and Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress  
538 responses. *Gene Expr.* *7*, 321–335.
- 539 Hashimoto, Y., Zhang, C., Kawauchi, J., Imoto, I., Adachi, M.T., Inazawa, J., Amagasa, T., Hai, T.,  
540 and Kitajima, S. (2002). An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its  
541 induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res.* *30*, 2398–2406.
- 542 Herda, S., Raczkowski, F., Mittrücker, H.-W., Willimsky, G., Gerlach, K., Kühl, A.A., Breiderhoff,  
543 T., Willnow, T.E., Dörken, B., Höpken, U.E., et al. (2012). The Sorting Receptor Sortilin Exhibits a  
544 Dual Function in Exocytic Trafficking of Interferon- $\gamma$  and Granzyme A in T Cells. *Immunity* *37*,  
545 854–866.
- 546 Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., and Schaller, C. (1999). Expression of the 100-  
547 kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res. Mol. Brain Res.*  
548 *65*, 216–219.
- 549 Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 2677–2689.
- 550 Hermey, G., Sjøgaard, S.S., Petersen, C.M., Nykjær, A., and Gliemann, J. (2006). Tumour necrosis  
551 factor  $\alpha$ -converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family  
552 members. *Biochem. J.* *395*, 285–293.
- 553 Hivelin, C., Mazella, J., and Coppola, T. (2017). Sortilin derived propeptide regulation during  
554 adipocyte differentiation and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *482*, 87–92.
- 555 Ho, H.H., Antoniv, T.T., Ji, J.-D., and Ivashkiv, L.B. (2008). Lipopolysaccharide-Induced  
556 Expression of Matrix Metalloproteinases in Human Monocytes Is Suppressed by IFN- $\gamma$  via  
557 Superinduction of ATF-3 and Suppression of AP-1. *J. Immunol.* *181*, 5089–5097.
- 558 Hoetzenecker, W., Echtenacher, B., Guenova, E., Hoetzenecker, K., Woelbing, F., Brück, J., Teske,  
559 A., Valtcheva, N., Fuchs, K., Kneilling, M., et al. (2012). ROS-induced ATF3 causes susceptibility to  
560 secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat. Med.* *18*, 128–134.
- 561 Jacobsen, L., Madsen, P., Moestrup, S.K., Lund, A.H., Tommerup, N., Nykjaer, A., Sottrup-Jensen,  
562 L., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1996). Molecular characterization of a novel human hybrid-  
563 type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* *271*,  
564 31379–31383.
- 565 Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M.S., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (2001).

### Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 566 Activation and Functional Characterization of the Mosaic Receptor SorLA/LR11. *J. Biol. Chem.* *276*,  
567 22788–22796.
- 568 Jadhav, K., and Zhang, Y. (2017). Activating transcription factor 3 in immune response and  
569 metabolic regulation. *Liver Res.* *1*, 96–102.
- 570 Jian, J., Zhao, S., Tian, Q., Gonzalez-Gugel, E., Mundra, J.J., Uddin, S.M., Liu, B., Richbourgh, B.,  
571 Brunetti, R., and Liu, C. (2013). Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR  
572 extracellular domains. *FEBS Lett.* *587*, 3428–3436.
- 573 Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., Le Marchand-  
574 Brustel, Y., Gual, P., Tanti, J.-F., and Cormont, M. (2009). Involvement of TNF- $\alpha$  in abnormal  
575 adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* *52*, 932–940.
- 576 Khuu, C.H., Barrozo, R.M., Hai, T., and Weinstein, S.L. (2007). Activating transcription factor 3  
577 (ATF3) represses the expression of CCL4 in murine macrophages. *Mol. Immunol.* *44*, 1598–1605.
- 578 Kitago, Y., Nagae, M., Nakata, Z., Yagi-Utsumi, M., Takagi-Niidome, S., Mihara, E., Nogi, T., Kato,  
579 K., and Takagi, J. (2015). Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA. *Nat.*  
580 *Struct. Mol. Biol.* *22*, 199–206.
- 581 Kjolby, M., Andersen, O.M., Breiderhoff, T., Fjorback, A.W., Pedersen, K.M., Madsen, P., Jansen,  
582 P., Heeren, J., Willnow, T.E., and Nykjaer, A. (2010). Sort1, encoded by the cardiovascular risk  
583 locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab.* *12*, 213–223.
- 584 Klingenberg, R., Gerdes, N., Badeau, R.M., Gisterå, A., Strodtzoff, D., Ketelhuth, D.F.J., Lundberg,  
585 A.M., Rudling, M., Nilsson, S.K., Olivecrona, G., et al. (2013). Depletion of FOXP3+ regulatory T  
586 cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *123*, 1323–1334.
- 587 Klinger, S.C., Glerup, S., Raarup, M.K., Mari, M.C., Nyegaard, M., Koster, G., Prabakaran, T.,  
588 Nilsson, S.K., Kjaergaard, M.M., Bakke, O., et al. (2011). SorLA regulates the activity of lipoprotein  
589 lipase by intracellular trafficking. *J Cell Sci* *124*, 1095–1105.
- 590 Kofler, J., and Wiley, C.A. (2011). Microglia: key innate immune cells of the brain. *Toxicol. Pathol.*  
591 *39*, 103–114.
- 592 Koga, M., Kai, H., Yasukawa, H., Yamamoto, T., Kawai, Y., Kato, S., Kusaba, K., Kai, M.,  
593 Egashira, K., Kataoka, Y., et al. (2007). Inhibition of Progression and Stabilization of Plaques by  
594 Postnatal Interferon- $\gamma$  Function Blocking in ApoE-Knockout Mice. *Circ. Res.* *101*, 348–356.
- 595 Kumar-Singh, S. (2011). Progranulin and TDP-43: Mechanistic Links and Future Directions. *J. Mol.*  
596 *Neurosci.* *45*, 561–573.
- 597 Labzin, L.I., Schmidt, S.V., Masters, S.L., Beyer, M., Krebs, W., Klee, K., Stahl, R., Lütjohann, D.,  
598 Schultze, J.L., Latz, E., et al. (2015). ATF3 Is a Key Regulator of Macrophage IFN Responses. *J.*  
599 *Immunol.* *195*, 4446–4455.
- 600 Lai, P.F., Cheng, C.F., Lin, H., Tseng, T.L., Chen, H.H., and Chen, S.H. (2013). ATF3 protects  
601 against LPS-induced inflammation in mice via inhibiting HMGB1 expression. *Evid. Based*  
602 *Complement. Alternat. Med.* *2013*, 716481.
- 603 Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic  
604 Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment.
- 605 Larsen, J.V., and Petersen, C.M. (2017). SorLA in interleukin-6 signaling and turnover. *Mol. Cell.*  
606 *Biol.* *37*, e00641–16.
- 607 Larsen, J.V., Hansen, M., Moller, B., Madsen, P., Scheller, J., Nielsen, M., and Petersen, C.M.

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 608 (2010). Sortilin Facilitates Signaling of Ciliary Neurotrophic Factor and Related Helical Type 1  
609 Cytokines Targeting the gp130/Leukemia Inhibitory Factor Receptor Heterodimer. *Mol. Cell. Biol.*  
610 *30*, 4175–4187.
- 611 Larsen, J.V., Kristensen, A.M., Pallesen, L.T., Bauer, J., Vægter, C.B., Nielsen, M.S., Madsen, P.,  
612 and Petersen, C.M. (2016). Cytokine-Like Factor 1, an Essential Facilitator of Cardiotrophin-Like  
613 Cytokine:Ciliary Neurotrophic Factor Receptor  $\alpha$  Signaling and sorLA-Mediated Turnover. *Mol.*  
614 *Cell. Biol.* *36*, 1272–1286.
- 615 Lebovitz, Y., Ringel-Scaia, V.M., Allen, I.C., and Theus, M.H. (2018). Emerging Developments in  
616 Microbiome and Microglia Research: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Front.*  
617 *Immunol.* *9*, 1993.
- 618 Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in  
619 Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* *58*, 253–263.
- 620 Lévesque, J.-P., Helwani, F.M., and Winkler, I.G. (2010). The endosteal “osteoblastic” niche and its  
621 role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* *24*, 1979–1992.
- 622 Liang, G., Wolfgang, C.D., Chen, B.P.C., Chen, T.-H., and Hai, T. (1996). ATF3 Gene GENOMIC  
623 ORGANIZATION, PROMOTER, AND REGULATION. *J. Biol. Chem.* *271*, 1695–1701.
- 624 Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* *407*, 233–241.
- 625 Makeyev, A.V., and Liebhaber, S.A. (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of  
626 functions and a search for mechanisms. *RNA N. Y. N* *8*, 265–278.
- 627 Mari Muriel, Bujny Miriam V., Zeuschner Dagmar, Geerts Willie J. C., Griffith Janice, Petersen  
628 Claus M., Cullen Pete J., Klumperman Judith, and Geuze Hans J. (2007). SNX1 Defines an Early  
629 Endosomal Recycling Exit for Sortilin and Mannose 6-Phosphate Receptors. *Traffic* *9*, 380–393.
- 630 Martin, S., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2003). Involvement of the neurotensin receptor-3 in the  
631 neurotensin-induced migration of human microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 1198–  
632 1205.
- 633 Martin, S., Dicou, E., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2005). Neurotensin and the neurotensin  
634 receptor-3 in microglial cells. *J. Neurosci. Res.* *81*, 322–326.
- 635 Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and  
636 polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 453–461.
- 637 May, A.E., Schmidt, R., Kanse, S.M., Chavakis, T., Stephens, R.W., Schömig, A., Preissner, K.T.,  
638 and Neumann, F.-J. (2002). Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in  
639 acute myocardial infarction. *Blood* *100*, 3611–3617.
- 640 Mazella, J. (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling  
641 and cellular trafficking? *Cell. Signal.* *13*, 1–6.
- 642 Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully,  
643 D., Maffrand, J.P., et al. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-  
644 coupled receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 26273–26276.
- 645 McCarthy, C., O’Gaora, P., James, W.G., McClelland, S., Fitzgerald, D.J., Belton, O., and de  
646 Gaetano, M. (2010). SorLA modulates atheroprotective properties of CLA by regulating monocyte  
647 migration. *Atherosclerosis* *213*, 400–407.
- 648 McClelland, S., Cox, C., O’Connor, R., de Gaetano, M., McCarthy, C., Cryan, L., Fitzgerald, D., and  
649 Belton, O. (2010). Conjugated linoleic acid suppresses the migratory and inflammatory phenotype of

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 650 the monocyte/macrophage cell. *Atherosclerosis* 211, 96–102.
- 651 Mendoza-Barberá, E., Julve, J., Nilsson, S.K., Lookene, A., Martín-Campos, J.M., Roig, R.,  
652 Lechuga-Sancho, A.M., Sloan, J.H., Fuentes-Prior, P., and Blanco-Vaca, F. (2013). Structural and  
653 functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. *J.*  
654 *Lipid Res.* 54, 649–661.
- 655 Mojic, M., Takeda, K., and Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN- $\gamma$ : Its Role in Promoting  
656 Cancer Immune-evasion. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- 657 Morinville, A., Martin, S., Lavallée, M., Vincent, J.-P., Beaudet, A., and Mazella, J. (2004).  
658 Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int. J. Biochem. Cell*  
659 *Biol.* 36, 2153–2168.
- 660 Mortensen, M.B., Kjolby, M., Gunnarsen, S., Larsen, J.V., Palmfeldt, J., Falk, E., Nykjaer, A., and  
661 Bentzon, J.F. (2014). Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and  
662 atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 124, 5317.
- 663 Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.*  
664 *Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- 665 Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R.,  
666 and Petersen, C.M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds  
667 the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180–2190.
- 668 Nilsson, S.K., Lookene, A., Beckstead, J.A., Gliemann, J., Ryan, R.O., and Olivecrona, G. (2007).  
669 Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family.  
670 *Biochemistry* 46, 3896–3904.
- 671 Nilsson, S.K., Christensen, S., Raarup, M.K., Ryan, R.O., Nielsen, M.S., and Olivecrona, G. (2008).  
672 Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the  
673 VPS10p domain receptor families. *J. Biol. Chem.* 283, 25920–25927.
- 674 Nishii, K., Nakaseko, C., Jiang, M., Shimizu, N., Takeuchi, M., Schneider, W.J., and Bujo, H.  
675 (2013). The Soluble Form of LR11 Protein Is a Regulator of Hypoxia-induced, Urokinase-type  
676 Plasminogen Activator Receptor (uPAR)-mediated Adhesion of Immature Hematological Cells. *J.*  
677 *Biol. Chem.* 288, 11877–11886.
- 678 Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q.,  
679 Watowich, S.S., Jetten, A.M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation  
680 of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483.
- 681 Nyborg, A.C., Ladd, T.B., Zwizinski, C.W., Lah, J.J., and Golde, T.E. (2006). Sortilin, SorCS1b, and  
682 SorLA Vps10p sorting receptors, are novel  $\gamma$ -secretase substrates. *Mol. Neurodegener.* 1, 3.
- 683 Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel,  
684 M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell  
685 death. *Nature* 427, 843–848.
- 686 Offe, K., Dodson, S.E., Shoemaker, J.T., Fritz, J.J., Gearing, M., Levey, A.I., and Lah, J.J. (2006).  
687 The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein  
688 traffic in endosomal compartments. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1596–1603.
- 689 Ohwaki, K., Bujo, H., Jiang, M., Yamazaki, H., Schneider, W.J., and Saito, Y. (2007). A Secreted  
690 Soluble Form of LR11, Specifically Expressed in Intimal Smooth Muscle Cells, Accelerates  
691 Formation of Lipid-Laden Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1050–1056.



## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 692 Pan, X., Zaarur, N., Singh, M., Morin, P., and Kandror, K.V. (2017). Sortilin and retromer mediate  
693 retrograde transport of Glut4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Biol. Cell* 28, 1667–1675.
- 694 Patel, A.B., Tsilioni, I., Leeman, S.E., and Theoharides, T.C. (2016). Neurotensin stimulates sortilin  
695 and mTOR in human microglia inhibitable by methoxyluteolin, a potential therapeutic target for  
696 autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- 697 Patel, K.M., Strong, A., Tohyama, J., Jin, X., Morales, C.R., Billheimer, J., Millar, J., Kruth, H., and  
698 Rader, D.J. (2015). Macrophage Sortilin Promotes LDL Uptake, Foam Cell Formation, and  
699 Atherosclerosis. *Circ. Res.* 116, 789–796.
- 700 Paushter, D.H., Du, H., Feng, T., and Hu, F. (2018). The lysosomal function of progranulin, a  
701 guardian against neurodegeneration. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 136, 1–17.
- 702 Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H.,  
703 Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a  
704 novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity  
705 chromatography. *J. Biol. Chem.* 272, 3599–3605.
- 706 Pirault, J., Polyzos, K.A., Petri, M.H., Ketelhuth, D.F.J., Bäck, M., and Hansson, G.K. (2017). The  
707 inflammatory cytokine interferon-gamma inhibits sortilin-1 expression in hepatocytes via the  
708 JAK/STAT pathway. *Eur. J. Immunol.* 47, 1918–1924.
- 709 Quistgaard, E.M., Madsen, P., Grøftehauge, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S.  
710 (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed  $\beta$ -propeller domain. *Nat. Struct. Mol.*  
711 *Biol.* 16, 96–98.
- 712 Reuter, E., Weber, J., Paterka, M., Ploen, R., Breiderhoff, T., van Horssen, J., Willnow, T.E., Siffrin,  
713 V., and Zipp, F. (2015). Role of Sortilin in Models of Autoimmune Neuroinflammation. *J. Immunol.*  
714 195, 5762–5769.
- 715 Rhost, S., Hughes, É., Harrison, H., Rafnsdottir, S., Jacobsson, H., Gregersson, P., Magnusson, Y.,  
716 Fitzpatrick, P., Andersson, D., Berger, K., et al. (2018). Sortilin inhibition limits secretion-induced  
717 progranulin-dependent breast cancer progression and cancer stem cell expansion. *Breast Cancer Res.*  
718 20, 137.
- 719 Rohe, M., Synowitz, M., Glass, R., Paul, S.M., Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2009). Brain-  
720 Derived Neurotrophic Factor Reduces Amyloidogenic Processing through Control of SORLA Gene  
721 Expression. *J. Neurosci.* 29, 15472–15478.
- 722 Rohe, M., Hartl, D., Fjorback, A.N., Klose, J., and Willnow, T.E. (2013). SORLA-Mediated  
723 Trafficking of TrkB Enhances the Response of Neurons to BDNF. *PLoS ONE* 8, e72164.
- 724 Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10,  
725 a028415.
- 726 Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C.C., Zhang, X.D.,  
727 Walker, M.M., and Hondermarck, H. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness  
728 and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* 6, 10473–10486.
- 729 Rosenberger, C.M., Clark, A.E., Treuting, P.M., Johnson, C.D., and Aderem, A. (2008). ATF3  
730 regulates MCMV infection in mice by modulating IFN- $\gamma$  expression in natural killer cells. *Proc. Natl.*  
731 *Acad. Sci.* 105, 2544–2549.
- 732 Ross, I. (2010). A bird's-eye view of macrophage biology. In *Lentiviruses and Macrophages:*  
733 *Molecular and Cellular Interactions*, (Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press), pp. 25–80.

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 734 Sakai, S., Nakaseko, C., Takeuchi, M., Ohwada, C., Shimizu, N., Tsukamoto, S., Kawaguchi, T.,  
735 Jiang, M., Sato, Y., Ebinuma, H., et al. (2012). Circulating soluble LR11/SorLA levels are highly  
736 increased and ameliorated by chemotherapy in acute leukemias. *Clin. Chim. Acta* *413*, 1542–1548.
- 737 Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-  
738 inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 878–888.
- 739 Schmidt, V., and Willnow, T.E. (2016). Protein sorting gone wrong – VPS10P domain receptors in  
740 cardiovascular and metabolic diseases. *Atherosclerosis* *245*, 194–199.
- 741 Schmidt, V., Schulz, N., Yan, X., Schürmann, A., Kempa, S., Kern, M., Blüher, M., Poy, M.N.,  
742 Olivecrona, G., and Willnow, T.E. (2016). SORLA facilitates insulin receptor signaling in adipocytes  
743 and exacerbates obesity. *J. Clin. Invest.* *126*, 2706–2720.
- 744 Schmidt, V., Subkhangulova, A., and Willnow, T.E. (2017). Sorting receptor SORLA: cellular  
745 mechanisms and implications for disease. *Cell. Mol. Life Sci.* *74*, 1475–1483.
- 746 Schuett, H., Oestreich, R., Waetzig, G.H., Annema, W., Luchtefeld, M., Hillmer, A., Bavendiek, U.,  
747 von Felden, J., Divchev, D., Kempf, T., et al. (2012). Transsignaling of interleukin-6 crucially  
748 contributes to atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 281–290.
- 749 Seaman, M.N.J. (2007). Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-  
750 mediated endosome-to-TGN retrieval. *J Cell Sci* *120*, 2378–2389.
- 751 Shalapour, S., and Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between  
752 good and evil. *J. Clin. Invest.* *125*, 3347–3355.
- 753 Shi, J., and Kandror, K.V. (2005). Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4  
754 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev. Cell* *9*, 99–108.
- 755 Strong, A., Ding, Q., Edmondson, A.C., Millar, J.S., Sachs, K.V., Li, X., Kumaravel, A., Wang,  
756 M.Y., Ai, D., Guo, L., et al. (2012). Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and  
757 LDL catabolism. *J. Clin. Invest.* *122*, 2807–2816.
- 758 Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in  
759 the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* *9*, 298–310.
- 760 Sung, H.Y., Lee, J.Y., Park, A.K., Moon, Y.J., Jo, I., Park, E.-M., Wang, K.-C., Phi, J.H., Ahn, J.-H.,  
761 and Kim, S.-K. (2018). Aberrant Promoter Hypomethylation of Sortilin 1: A Moyamoya Disease  
762 Biomarker, Aberrant Promoter Hypomethylation of Sortilin 1: A Moyamoya Disease Biomarker. *J.*  
763 *Stroke* *20*, 350–361.
- 764 Tang, W., Lu, Y., Tian, Q.-Y., Zhang, Y., Guo, F.-J., Liu, G.-Y., Syed, N.M., Lai, Y., Lin, E.A.,  
765 Kong, L., et al. (2011). The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic  
766 against inflammatory arthritis in mice. *Science* *332*, 478–484.
- 767 Tanimoto, R., Palladino, C., Xu, S.-Q., Buraschi, S., Neill, T., Gomella, L.G., Peiper, S.C., Belfiore,  
768 A., Iozzo, R.V., and Morrione, A. (2017). The perlecan-interacting growth factor progranulin  
769 regulates ubiquitination, sorting, and lysosomal degradation of sortilin. *Matrix Biol. J. Int. Soc.*  
770 *Matrix Biol.* *64*, 27–39.
- 771 Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R.,  
772 Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a  
773 receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5455–5463.
- 774 Tjwa, M., Sidenius, N., Moura, R., Jansen, S., Theunissen, K., Andolfo, A., De Mol, M., Dewerchin,  
775 M., Moons, L., Blasi, F., et al. (2009). Membrane-anchored uPAR regulates the proliferation, marrow

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 776 pool size, engraftment, and mobilization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *J. Clin.*  
777 *Invest.* *119*, 1008–1018.
- 778 Trumpp, A., Essers, M., and Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat.*  
779 *Rev. Immunol.* *10*, 201–209.
- 780 Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the  
781 crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell*  
782 *Res.* *1843*, 2563–2582.
- 783 Tzachanis, D., Berezovskaya, A., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2002). Blockade of B7/CD28  
784 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated  
785 macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* *99*, 1465–1473.
- 786 Vázquez, C.L., Rodgers, A., Herbst, S., Coade, S., Gronow, A., Guzman, C.A., Wilson, M.S.,  
787 Kanzaki, M., Nykjaer, A., and Gutierrez, M.G. (2016). The proneurotrophin receptor sortilin is  
788 required for *Mycobacterium tuberculosis* control by macrophages. *Sci. Rep.* *6*.
- 789 Wahe, A., Kasmapur, B., Schmaderer, C., Liebl, D., Sandhoff, K., Nykjaer, A., Griffiths, G., and  
790 Gutierrez, M.G. (2010). Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is  
791 mediated by sortilin. *J. Cell Sci.* *123*, 2502–2511.
- 792 Whittle, A.J., Jiang, M., Peirce, V., Relat, J., Virtue, S., Ebinuma, H., Fukamachi, I., Yamaguchi, T.,  
793 Takahashi, M., Murano, T., et al. (2015). Soluble LR11/SorLA represses thermogenesis in adipose  
794 tissue and correlates with BMI in humans. *Nat. Commun.* *6*, 8951.
- 795 Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloue, F., and Jauberteau, M.-O.  
796 (2014a). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase  
797 receptors. *J. Cell Sci.* *127*, 3983–3997.
- 798 Wilson, C.M., Naves, T., Saada, S., Pinet, S., Vincent, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O.  
799 (2014b). The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases.  
800 *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* *13*, 1354–1365.
- 801 Wilson, C.M., Naves, T., Al Akhrass, H., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and  
802 Jauberteau, M.-O. (2016). A new role under sortilin's belt in cancer. *Commun. Integr. Biol.* *9*,  
803 e1130192.
- 804 Yabe-Wada, T., Matsuba, S., Takeda, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Takai, T., Shi, H.,  
805 Philpott, C.C., and Nakamura, A. (2016). TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine  
806 trafficking mediator sortilin. *Sci. Rep.* *6*.
- 807 Yabe-Wada, T., Matsuba, S., Unno, M., and Onai, N. (2018). Crystal structure of the ligand-free  
808 form of the Vps10 ectodomain of dimerized Sortilin at acidic pH. *FEBS Lett.* *592*, 2647–2657.
- 809 Yang, M., Lim, Y., Li, X., Zhong, J.-H., and Zhou, X.-F. (2011). Precursor of Brain-derived  
810 Neurotrophic Factor (proBDNF) Forms a Complex with Huntingtin-associated Protein-1 (HAP1) and  
811 Sortilin That Modulates proBDNF Trafficking, Degradation, and Processing. *J. Biol. Chem.* *286*,  
812 16272–16284.
- 813 Yu, X.-H., Fu, Y.-C., Zhang, D.-W., Yin, K., and Tang, C.-K. (2013). Foam cells in atherosclerosis.  
814 *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *424*, 245–252.
- 815 Yu, Y., Correll, P.H., and Heuvel, J.P.V. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inf  
816 lammatory products in macrophages: evidence for a PPARγ-dependent mechanism. *Biochim.*  
817 *Biophys. Acta* *11*.

## Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

- 818 Zhang, X.-M., Dormady, S.P., and Basch, R.S. (2000). Identification of four human cDNAs that are  
819 differentially expressed by early hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 28, 1286–1296.
- 820 Zhao, G., Zhu, G., Huang, Y., Zheng, W., Hua, J., Yang, S., Zhuang, J., and Ye, J. (2016). IL-6  
821 mediates the signal pathway of JAK-STAT3-VEGF-C promoting growth, invasion and  
822 lymphangiogenesis in gastric cancer. *Oncol. Rep.* 35, 1787–1795.
- 823 Zheng, S., and Abraham, C. (2013). NF- $\kappa$ B1 Inhibits NOD2-Induced Cytokine Secretion through  
824 ATF3-Dependent Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4857–4871.
- 825 Zhong, L., Cayabyab, F.S., Tang, C., Zheng, X., Peng, T., and Lv, Y. (2016). Sortilin: A novel  
826 regulator in lipid metabolism and atherogenesis. *Clin. Chim. Acta* 460, 11–17.

827

### 828 Figure legends

829 **Figure 1: Role of Vps10p domain receptors in intracellular protein trafficking.** (A) Schematic  
830 representation of sortilin and SorLA protein domains. (B) Trafficking pathways of Vps10p domain  
831 receptors. The propeptide is cleaved by pro-protein convertases in the trans Golgi network (step 1).  
832 Vps10p domain receptors associated with a protein partner can then be secreted from the TGN to  
833 extracellular vesicles through secretory granules (step 2) or addressed to the plasma membrane via  
834 constitutive secretory vesicles. Partners can either be anchored to the membrane or secreted as  
835 soluble proteins (steps 3-4). Once anchored to the membrane, Vps10p domain receptors can undergo  
836 proteolytic cleavage by a disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 or ADAM17, followed by  $\gamma$ -  
837 secretase, and be released under a soluble form (step 5). They can mediate internalization of partners  
838 from the plasma membrane through AP-2/clathrin-dependent endocytosis (step 6). They can  
839 navigate, alone or with partners, between early endosomes and the TGN via the retromer complex  
840 (step 7) or anterograde transport via interaction with GCAs/AP-1 (step 8). Early endosomes mature  
841 into late endosomes or multi-vesicular bodies (step 9). From there, Vps10p domain receptors and  
842 their partners can either be addressed to the lysosome for degradation (step 10) or exocytized in  
843 exosomes (step 11).

844 **Figure 2: Sortilin and SorLA regulate IL-6 family signaling.** (A) CNTF binds to CNTFR $\alpha$ , this  
845 complex engages the heterodimer gp130/LIFR $\beta$  to induce JAK/STAT pathway signaling. Sortilin can  
846 bind to LIFR $\beta$  and enhance this JAK/STAT signaling. Sortilin also mediates soluble CNTF cellular  
847 uptake, and decreases associated signaling. (B) SorLA interacts with CLF-1. CLF-1 can form a  
848 complex with CLC and CNTFR $\alpha$ . If this complex is soluble, SorLA binds to CLF-1 and concentrates  
849 the complex on the membrane, enhancing interaction with gp130/LIFR $\beta$  and JAK/ STAT signaling.  
850 If this complex is anchored to the membrane, SorLA binds to CLF-1 and mediates endocytosis of the  
851 complex, followed by its degradation, decreasing associated signaling. (C) SorLA can bind to IL-6 or  
852 IL-6R. Binding of IL-6 to membrane anchored IL-6R, in association with gp130 homodimer, induces  
853 *cis* signaling (JAK/STAT pathway). SorLA can bind IL-6R and inhibits IL-6 binding and subsequent  
854 signaling. IL-6 can also engage soluble IL-6R, associated with gp130 homodimer, and induce *trans*  
855 signaling (NF- $\kappa$ B pathway). SorLA may bind to soluble IL-6 and act as a stabilizer, enhancing IL-6  
856 half-life, and thus *trans* signaling. Additionally, SorLA negatively controls IL-6 turnover by binding  
857 to IL-6 or sIL-6R and mediating their endocytosis, followed by lysosomal degradation.

858

859 **Figure 3: In macrophages, sortilin is implicated in antigen scavenging and phagosome**  
860 **maturation.** (A) Sortilin and scavenger receptor CD206 are addressed from the TGN to the plasma

24

### Regulatory roles of Sortilin and SorLA in immune-related processes

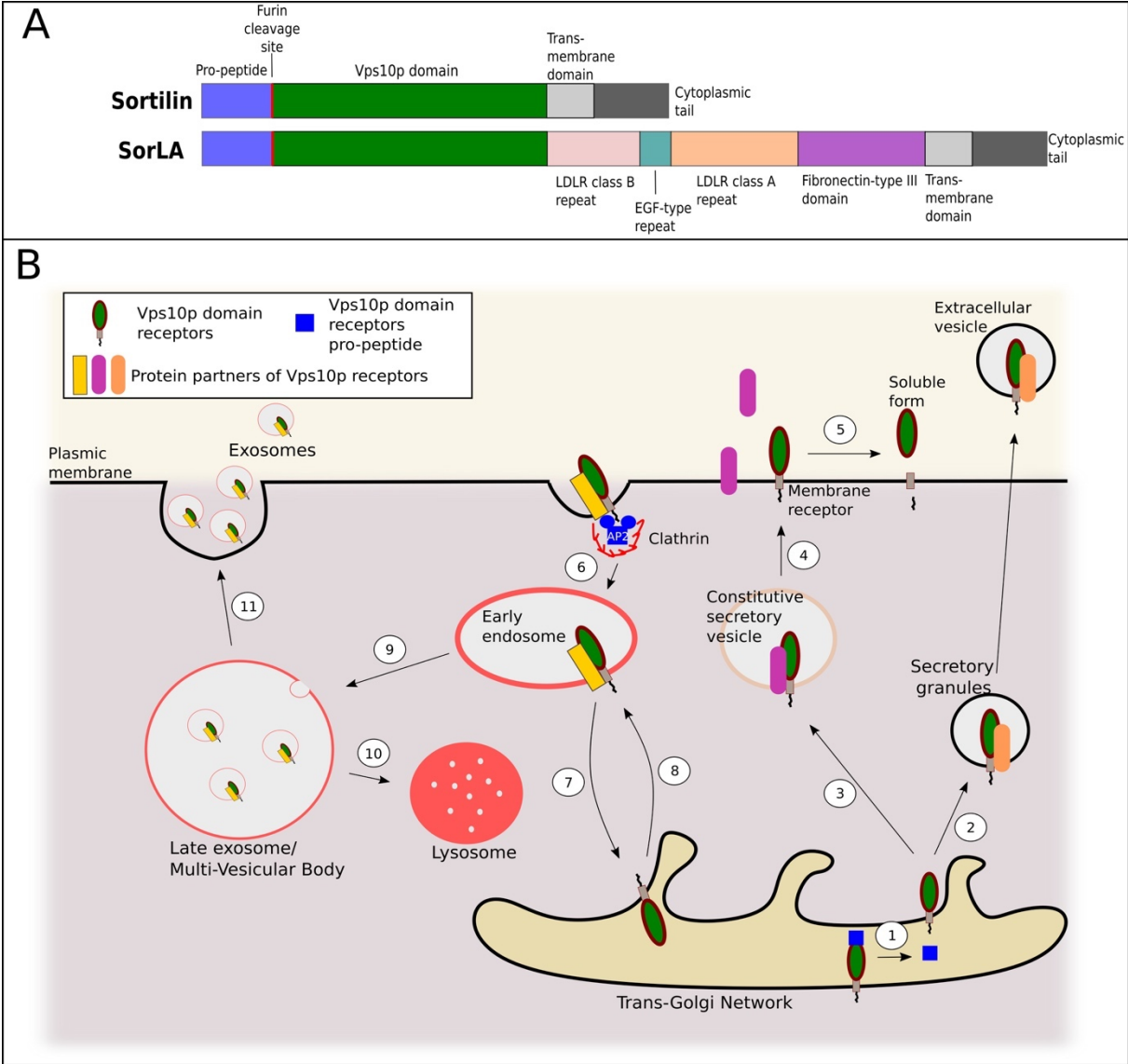
861 membrane. In Alternatively Associated Macrophages (AAMs), sortilin can bind extracellular  
862 antigens and mediate their endocytosis. Antigens are then degraded in the lysosome, and AAMs  
863 being incapable of antigen processing, antigen peptides are not presented to T cells by class 2 MHC.  
864 (B) Upon phagocytosis of mycobacteria by macrophages, NF- $\kappa$ B pathway is activated, inducing  
865 *SORT1* transcription. Sortilin is then transported and vehicles Acid Sphingomyelinase, to early  
866 phagosomes. This step is crucial to phagosome maturation and mycobacteria growth arrest and  
867 degradation.

868

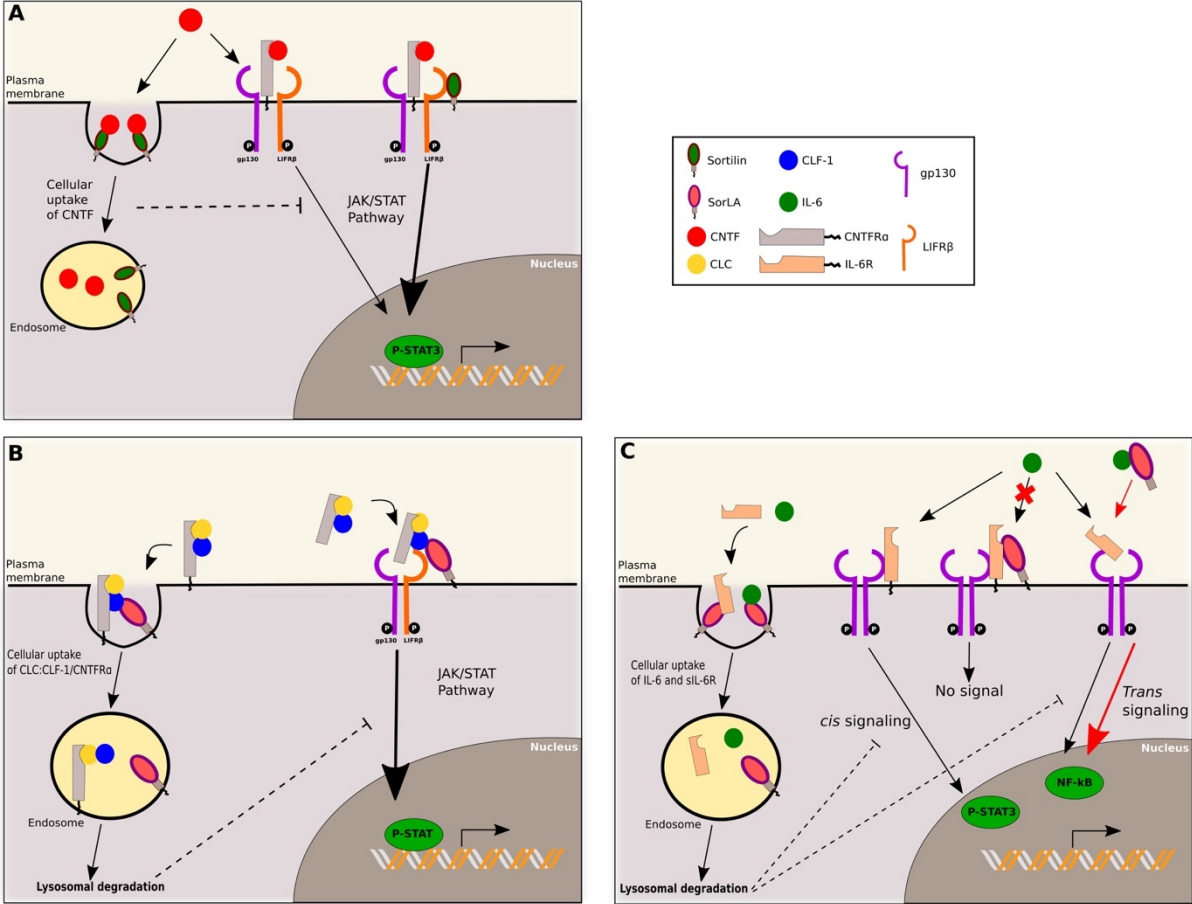
869 **Figure 4: Implications of sortilin and SorLA in immune-related processes.** Blue circles represent  
870 cellular models expressing sortilin or SorLA. Blank circles represent pathways/processes/proteins  
871 modified by sortilin or SorLA. Red circles represent physiological or pathological processes induced.  
872 Green arrows mean a stimulating role, while red arrows mean an inhibition. The red arrow with a  
873 black cross means that the inhibition is lifted.

874

**Figure 1 : Role of Vps10p domain receptors in intracellular protein trafficking**



**Figure 2 : Sortilin and SorLA regulate IL-6 family signaling**



**Figure 3 : In macrophages, sortilin is implicated in antigen scavenging and phagosome maturation**

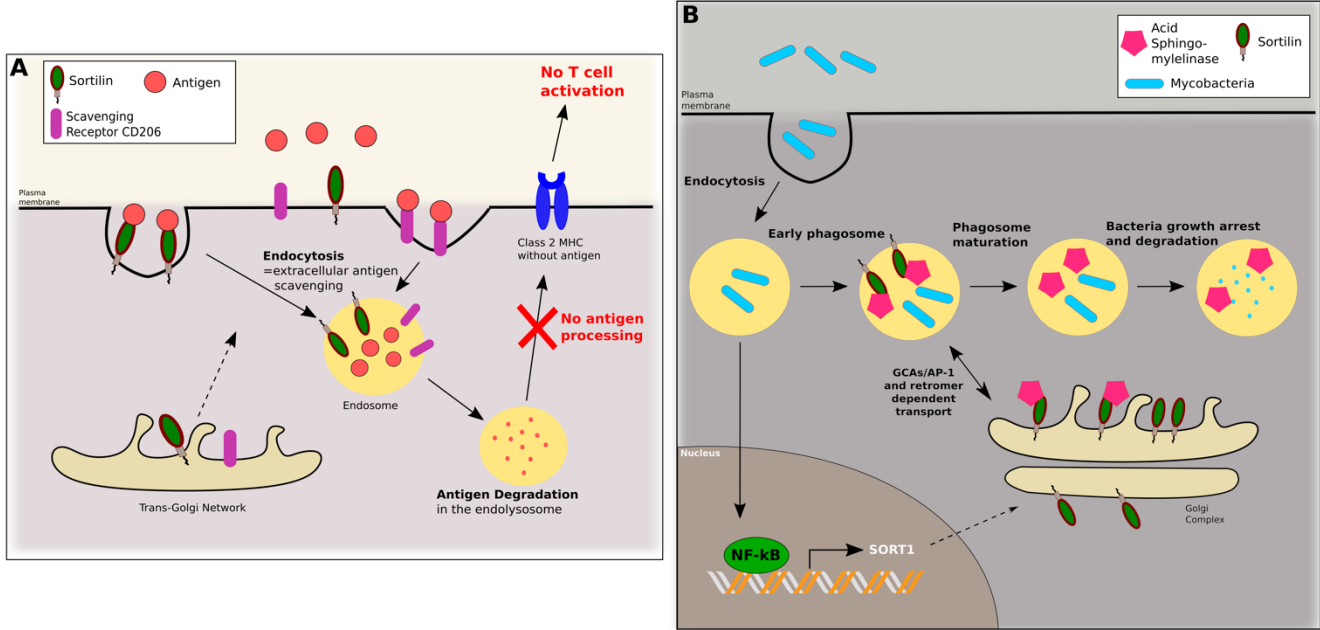
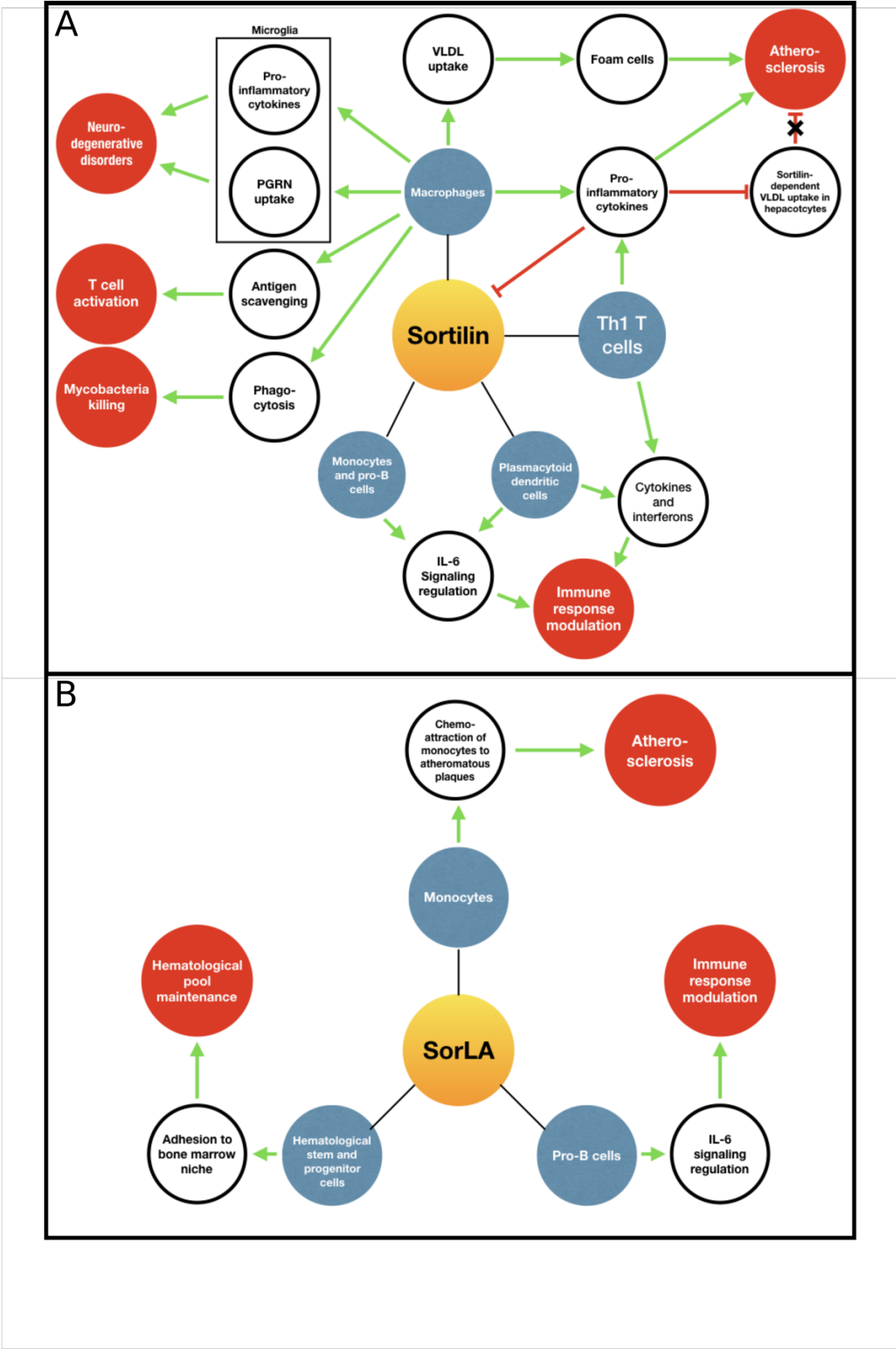




Figure 4 : Implications of sortilin and SorLA in immune-related processes





## **Résistance des lymphocytes B à la mort cellulaire au cours de la leucémie lymphoïde chronique : implications d'une neurotrophine, le BDNF, du récepteur de la neurotensine NTSR2, et des « nurse-like cells ».**

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation, dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires, de lymphocytes B matures résistants à l'apoptose. Le microenvironnement tumoral de la LLC au sein des organes lymphoïdes secondaires, et notamment les « Nurse-Like Cells » (NLCs), joue un rôle majeur dans la promotion de la survie et de la prolifération des cellules leucémiques. Au cours de cette étude, la surexpression du récepteur de la neurotensine NTSR2, un récepteur couplé aux protéines G, a été caractérisée. Il est activé de façon constitutive dans les cellules leucémiques circulantes, et son activation dépend de son interaction avec le récepteur à activité tyrosine kinase TrkB suite à la liaison de son ligand, le BDNF, tous deux également surexprimés. L'activation de NTSR2-TrkB par le BDNF entraîne une signalisation de survie par les voies Src et Akt, aboutissant à la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. L'inhibition du récepteur NTSR2 dans ces cellules fait diminuer leur viabilité. En présence des NLCs, les expressions de NTSR2, TrkB, BDNF, et de la sortiline, protéine de transport des neurotrophines et des récepteurs Trk, est accentuée. Les NLCs produisent elle-même du BDNF, activent la voie de signalisation Src, et leur rôle protecteur des cellules leucémiques est BDNF-dépendant. L'ensemble de ces travaux met en évidence un rôle capital de NTSR2-TrkB-BDNF dans la signalisation de survie des cellules leucémiques circulantes et au sein du microenvironnement tumoral de la LLC, et pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

Mots-clés : LLC, apoptose, neurotrophine, BDNF, NTSR2, microenvironnement, NLCs

## **B lymphocytes apoptosis resistance in chronic lymphocytic leukemia : implication of a neurotrophin, BDNF, the neurotensin receptor NTSR2, and Nurse-Like Cells**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a malignant hemopathy characterized by the accumulation of apoptosis resistant mature B lymphocytes in peripheral blood and secondary lymphoid organs. In these secondary lymphoid organs, the tumor microenvironment, notably Nurse-like Cells (NLCs), plays a major role in leukemic cells survival and proliferation promotion. In this study, an overexpression of neurotensin receptor NTSR2, a G-protein coupled receptor, was identified. NTSR2 is constitutively activated in circulating leukemic cells and its activation depends on its interaction with tyrosine kinase activity receptor TrkB upon binding of its ligand, BDNF. Activation of NTSR2-TrkB by BDNF induces survival signaling by Src and Akt pathways, and in term anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL overexpression. Inhibition of NTSR2 in those cells impacts their viability. In the presence of NLCs, expressions of NTSR2, TrkB, BDNF, and sortilin, a neurotrophin and Trk receptor transport regulator, are enhanced. NLCs produce BDNF, stimulate Src activation, and their protective role on leukemic cells is BDNF-dependent. Taken together, this study highlights a key role of NTSR2-TrkB-BDNF in leukemic cells survival signaling, both in the circulation or in the tumor microenvironment, and might thus constitute a potential new therapeutic target.

Keywords : CLL, apoptosis, neurotrophin, BDNF, NTSR2, microenvironment, NLCs

