

**UNIVERSITE PARIS 13**

U.F.R. LEONARD DE VINCI  
SANTÉ-MÉDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE DE SCIENCE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Maude QUETTIER**

Le 3 Février 2015

Titre :

**Etudes des altérations fonctionnelles de la signalisation  
dépendante du récepteur à l'antigène dans les cellules B de la  
Leucémie Lymphoïde Chronique**

Directeur de thèse : Dr. Christine LE ROY

**JURY :**

Pr. Didier LUTOMSKI, Président  
Dr. Loïc YSEBAERT, Rapporteur  
Pr. Bernard PAYRASTRE, Rapporteur  
Dr. Jacques NUNES, Examineur  
Dr. Christine LE ROY, Directrice



**UNIVERSITE PARIS 13**

U.F.R. LEONARD DE VINCI  
SANTÉ-MÉDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE DE SCIENCE**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

par

**Maude QUETTIER**

Le 3 Février 2015

Titre :

**Etudes des altérations fonctionnelles de la signalisation  
dépendante du récepteur à l'antigène dans les cellules B de la Leucémie  
Lymphoïde Chronique**

Directeur de thèse : Dr. Christine LE ROY

**JURY :**

Pr. Didier LUTOMSKI, Président

Dr. Loïc YSEBAERT, Rapporteur

Pr. Bernard PAYRASTRE, Rapporteur

Dr. Jacques NUNES, Examineur

Dr. Christine LE ROY, Directrice



## REMERCIEMENTS

Parce que le doctorat n'est pas le résultat d'un effort strictement personnel mais celui du travail de toute une équipe, il est temps pour moi de remercier les personnes qui ont cru en moi et m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement le **Dr. Christine Le Roy** pour m'avoir fait confiance sur ce projet lors de mon stage de M2 et pour avoir persévéré à mes côtés en thèse. J'ai apprécié à la fois sa rigueur scientifique et sa tolérance face à mes idées, quelles qu'elles soient, qu'elle m'a laissé exprimer tant sur le plan théorique que sur le plan pratique. J'ai apprécié sa remarquable disponibilité et son investissement malgré les nombreux rôles qu'elle endosse au sein de l'unité. J'ai également apprécié ses encouragements pour aller discuter de mes résultats avec d'autres chercheurs de l'unité ou extérieurs et pour aller présenter mes travaux en congrès. Je suis fière qu'elle soit, à terme, ma directrice officielle de thèse.

Je remercie le **Dr. Nadine Varin-Blank** pour avoir co-encadré un temps ma thèse, pour avoir continué à superviser mes travaux quand les circonstances le nécessitaient, pour m'avoir également encourager à publier oralement ces travaux et, plus généralement, pour prendre le temps de faire régner une ambiance de travail solidaire et sympathique en plus de ses autres responsabilités en qualité de directeur de recherche.

J'exprime également mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse:

- le **Dr. Loïc Ysebaert** et le **Pr. Bernard Payrastra** de me faire l'honneur d'être rapporteurs
- le **Dr. Jacques Nunes** pour avoir accepté d'examiner mes travaux
- le **Pr. Didier Lutomski** en qualité de président du jury

Je porte également une attention toute particulière à l'équipe "LLC", à commencer par les **Pr. Florence Cymbalista** et **Vincent Levy** (Hôpital Avicenne, Bobigny) qui nous ont procuré les échantillons de sang issus de patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) et les bilans cliniques associés. Je remercie également **Florence Cymbalista** pour le regard clinique qu'elle a eu sur mes résultats lors de mes présentations orales. Un grand merci aux "Steph", le tout frais **Dr. Stéphane Saint-Georges** auprès de qui j'ai beaucoup appris et **Stéphanie Le Coquil** dont l'aide technique m'a été précieuse. Ce sont deux amis au grand cœur, plein de bonne humeur et sur qui j'ai toujours pu compter. Merci également au **Dr. Anne Quinquenel** qui a été, entre autres, une

agréable et intéressante partenaire de paillasse. Je remercie les **Dr. Bela Papp, Laura Gardano, Ravi Matti et Hervé Roudot** pour leur coopération dans le bon fonctionnement de cette équipe "LLC" bien menée par **Christine Le Roy**.

Je tiens à remercier le **Pr. Laurence Le Moyec** et son équipe de m'avoir initiée à la recherche dans la cadre d'un stage de M1 intitulé "Influence de l'entraînement sur le métabolome de la souris" (CNRS 3207, UFR SMBH, Bobigny).

Je remercie également le **Pr. Dominique Ledoux** de m'avoir encouragée à poursuivre mon cursus en thèse et pour sa présence lors de préparations de présentations orales. J'en profite pour le féliciter de ses excellentes qualités de pédagogue.

Je remercie encore **Stéphane Saint-Georges** et **Dominique Ledoux** de m'avoir impliquée dans le projet "CXCR4", ce fut une collaboration très enrichissante. Ce fut également un plaisir de partager "Syk" avec le jeune **Dr. Maximilien Cottat**, toujours motivé et souriant.

J'ai également apprécié la disponibilité et l'enthousiasme du **Dr. Lionel Guittat** à discuter, quand j'en ai eu besoin, de mes résultats fraîchement obtenus.

De manière générale, je remercie tous les membres de l'unité U978 pour nos échanges scientifiques et culturels enrichissants: **Lamia, Anouchka, Vanessa, Lyra, Hajer, Denis, Laura V, Fanny, Remi** et tous ceux que j'ai déjà ou que je n'ai pas cité (la liste est longue) ainsi que l'UFR SMBH pour la bonne humeur dans laquelle j'ai eu la chance d'effectuer mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier le **Dr. Patrice Decker** et ses étudiants en thèse, **Julie Mussard** et **Matthieu Ribon** (INSERM UMR 1125, UFR SMBH, Bobigny), d'avoir fait appel à mes compétences techniques sur un projet qui a aboutit à la publication d'un article intitulé: Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. Lindau D, Mussard J, Wagner BJ, Ribon M, Rönnefarth VM, Quettier M, Jelcic I, Boissier MC, Rammensee HG and Decker P. Eur J Immunol 2013; 43(8):2101-13.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres de la plateforme de spectrométrie de masse et en particulier au **Dr. Florence Poirier** et au **Pr. Didier Lutomski** (UMR 7244 CNRS CSPBAT, UFR SMBH, Bobigny) qui m'ont donné accès à ce bel outil technique. Je tiens à vous remercier pour votre accueil, votre sympathie et votre investissement.

Ces travaux n'auraient pas pu être menés à bien sans financement. C'est pourquoi j'aimerais remercier **l'Ecole Doctorale de l'Université Paris 13** de m'avoir octroyé un contrat doctoral (3

ans) ainsi que l'association de **La Ligue Contre le Cancer** de m'avoir accordé un financement de fin de thèse (6 mois).

Notre participation au projet pilote collaboratif avec le Pr. R. Balderas, "Functional analysis of signalling complexes and flow cytometry characterization of phosphorylated biomarkers" (société Becton Dickinson ; dpt R&D, San Diego, USA) a également rendu possible une partie de mes travaux.

Je porte une mention particulière à **Elodie Lemadre**, collègue de bureau fraîchement diplômée mais avant tout amie dans la vie. J'ai adoré partager les bons moments de ce petit bout de carrière avec toi et je te remercie de m'avoir soutenue dans les moments plus délicats.

Je porte une autre attention toute particulière à mes proches en dehors du cadre professionnel, à commencer par mon mari qui m'a accompagné quotidiennement tout au long de mon parcours doctoral. Je te remercie pour ton écoute et tes suggestions sur le plan scientifique mais je préfère de loin te remercier pour ta présence, pour l'attention et l'équilibre que tu m'as apporté et pour ton investissement et ta motivation quand il a s'agit de nous changer les idées.

Je prête une délicate attention à mon père, ma mère, mon frère et ma sœur sans qui je ne serai pas ce que je suis. Je m'excuse de ne pas toujours avoir été très présente ces dernières années mais je vous remercie chaleureusement pour votre compréhension, votre soutien et le réconfort que vous m'avez toujours apporté.

Je tiens également à remercier mon groupe d'athlétisme et mon entraîneur avec lesquels j'ai pu me défouler et me vider l'esprit après les journées difficiles ou frustrantes. C'est auprès d'eux que j'ai appris à gérer mon stress en compétition et c'est une qualité qui m'aura servi lors de mes présentations orales devant un public.

Les filles, Marie, July, Kti, Kris, Carole, merci pour ces bons moments partagés qui me rappellent toujours d'où je viens, merci d'être là, merci d'être vous. Une dédicace particulière aux petits plats de Marie parfois trouvés sur ma table en rentrant à pas d'heure, un vrai bonheur!

Je remercie mon frère et mon cousin, tata Nadine, Véra et Guy et Elodie et Julien pour m'avoir offert de bon cœur un hébergement lors de mes retours en région parisienne.

Je ne pourrais pas citer tout le monde mais je remercie tous ceux qui m'ont toujours épaulé et encouragé, tous ceux qui ont participé à mon équilibre.





# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES .....	7
ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	15
I. HOMEOSTASIE DES CELLULES B ET RECEPTEUR A L'ANTIGENE .....	15
I.1. Homéostasie au cours du développement.....	15
I.1.1. Hématopoïèse chez l'adulte .....	15
I.1.2. Différenciation de la lignée B.....	16
I.1.2.1. Maturation des cellules B dans la moelle osseuse.....	17
I.1.2.1.1. Réarrangement des chaines lourdes et assemblage du pre-BCR.....	18
I.1.2.1.2. Réarrangement des chaines légères et assemblage du BCR.....	21
I.1.2.2. Devenir des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires .....	22
I.2. Régulation de l'homéostasie via le BCR.....	26
I.2.1. Maturation folliculaire.....	26
I.2.1.1. Présentation de l'antigène.....	26
I.2.1.2. Changements génétiques du BCR.....	28
I. 2.1.2.1. Hypermutation somatique.....	28
I.2.1.2.2. Commutation de classe des Ig .....	29
I.2.1.3. Sélection clonale et homéostasie <i>via</i> le BCR .....	30
I.2.2. Trafic ganglionnaire .....	30
I.2.2.1. Entrée dans les ganglions .....	31
I.2.2.2. Trafic intra-ganglionnaire .....	32
I.2.2.3. Trafic membranaire: Le BCR et sa signalisation .....	33
I.2.2. Signalosome autour du BCR.....	35
I.2.2.1. Syk.....	35
I.2.2.1.1. Rôles au cours du développement B.....	35
I.2.2.1.2. Autres voies impliquant Syk .....	36

I.2.2.1.3. Structure et activation.....	39
I.2.2.1.4. Régulation.....	45
I.2.2.1.5. Fonctions.....	49
I.2.2.2. Partenaires de Syk.....	50
I.2.2.2.1. Régulateurs mixtes: les SFKs .....	50
I.2.2.2.2. Régulateurs positifs.....	53
I.2.2.2.3. Régulateurs négatifs.....	64
I.2.3. Voies d'activation conduisant à l'homéostasie.....	68
I.2.3.1. Messagers secondaires et réponse calcique .....	68
II.          ALTERATION DE L'HOMÉOSTASIE DES CELLULES B : LA LLC .....	71
II.1. Déséquilibre de l'homéostasie dans la LLC.....	71
II.1.1. Origine et facteurs cliniques.....	71
II.1.1.1. Origine.....	71
II.1.1.2. Stades .....	72
II.1.1.3. Caractéristiques de la LLC.....	72
II.1.2. Accumulation d'un pool de cellules B-LLC .....	73
II.1.2.1. Balance survie / apoptose.....	73
II.1.2.2. Rôle du microenvironnement .....	74
II.2. Signalisation du BCR et progression de la maladie .....	78
II.2.1. Dérégulation du BCR .....	78
II.2.1.1. Synthèse et expression.....	78
II.2.1.1.1. Isotypes .....	78
II.2.1.1.2. Niveau d'expression.....	78
II.2.1.1.3. Synthèse altérée .....	79
II.2.1.3. Répertoire biaisé.....	79
II.2.1.3.1. Statut mutationnel des IgVH .....	80
II.2.1.3.2. Activation indépendante de l'antigène .....	81
II.2.1.3.2. Anergie .....	82
II.2.1.3.4. Statut de réponse à l'antigène.....	83
II.2.2. Signalosome autour de Syk.....	83
II.2.2.1. Syk.....	83
II.2.2.2. Partenaires de Syk.....	85

II.2.2.2.1. SFKs.....	85
II.2.2.2.2. Régulateurs positifs .....	86
II.2.2.2.3. Régulateurs négatifs .....	88
II.2.3. Dérégulation des voies d'activation et des facteurs de transcription .....	89
II.2.3.1. Voies de la survie cellulaire.....	89
II.2.3.2. Voies de la prolifération cellulaire .....	91
II.2.3.3. Voies de la migration.....	91
II.3. Traitements de la LLC.....	91
II.3.1. FCR et BR en traitement de première ligne .....	92
II.3.2. Ciblage du microenvironnement.....	92
II.3.3. Ciblage des kinases de la voie du BCR.....	93
II.3.3.1. Inhibiteurs de Lyn : le Dasatinib .....	93
II.3.3.2. Inhibiteur de Syk : le FosD.....	93
II.3.3.3. Inhibiteur de Btk : l'Ibrutinib .....	95
II.3.3.4. Inhibiteur de la PI3Kδ : l'Idelalisib.....	96
OBJECTIFS DE LA THESE .....	97
RESULTATS .....	99
ARTICLE 1 : Implication des intermédiaires de la signalisation du BCR dans l'évolutivité de la LLC .....	99
MANUSCRIT 2 : Implication fonctionnelle de Syk dans la survie des cellules B de la Leucémie Lymphoïde Chronique en réponse à une stimulation antigénique .....	101
Résultats complémentaires.....	103
MANUSCRIT 3 : Implication des PKD dans l'internalisation du CXCR4 après activation du BCR des cellules B-LLC.....	107
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	109
ANNEXES .....	121
BIBLIOGRAPHIE .....	123



## ABBREVIATIONS

Ac	Acide
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
Ag	Antigène
AID	Activation-induced cytidine deaminase
APRIL	Proliferation-inducing ligand
ARN	Acide Ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAFF	B cell Activating Factor
BCAP	B-cell PI3K adaptor protein
BCMA	B cell maturation antigen
BCR	B Cell Receptor
BEC	Cellules sanguines endothéliales
BL	Lymphomes de Burkitt
B-LLC	Cellules B de patients LLC
BLNK	B Cell Linker
BMSC	Bone marrow stromal cells
BR	Bendamustine - Rituximab
Btk	Bruton's Tyrosine Kinase
Cbl	Casitas B-lineage Lymphoma
CD	Cluster Differentiation
cdk 4	Cyclin dependent kinase 4
CDR 3	Complementary Determining Region-3
CG	Centre Germinatif
CH	Calponin Homology domain
C <sub>H</sub>	Constant Heavy
C <sub>L</sub>	Constant Light
CLEC-2	C-type lectin-like receptor
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CLR	Récepteurs aux lectines de type C
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Common Myeloid Progenitor
CPA	Cellule Présentatrice d'antigène
Csk	COOH-terminal Src Kinase
CSR	Class Switch Recombination
CXCL12	CXC-motif Ligand 12

CXCR4	CXC-motif Receptor 4
DAG	DiAcylGlycerol
DAP12	Death-associated protein 12
DBL	Diffuse B-cell lymphoma
DC	Cellules dendritiques
DH	Dbl Homology domain
DN	Double Négatif
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
Fc	Fragment, crystallizable d'un anticorps
FCL	Lymphomes à cellules folliculaires
FcR	Récepteur Fc
FCR	Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab
FDA	Food and Drug Administration
FDC	Cellules dendritiques folliculaires
FO	Cellules B Folliculaires
FosD	Fostamatinib disodium
FR	Framework region
FRC	Cellules réticulaires fibroblastiques
G-CSF	Granulocyte - Colony Stimulating Factor
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factors
GEP	Profil d'expression génique
GL	Germline
GMP	Granulocyte - Monocyte Progenitor
GPVI	Glycoprotéine VI
GTPases	Guanosine triphosphatases
HCDR3	Heavy CDR3
HEV	High Endothelial Venule
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
Ig	Immunoglobuline
IgM/D	Immunoglobuline de type M/D
IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL-7	InterLeukine 7
IP3	Inositol 1,4,5 triPhosphate
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
LDT	Temps de doublement lymphocytaire
LFA-1	Leucocyte-Function-associated Antigen 1

LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LT-HSC	Long Term - Hematopoietic Stem Cell
M	Mutated
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MKEP	MegaKaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MPP	MultiPotent Progenitor
MSC	Cellules stromales mésenchymateuses
MZ	Marginal Zone
NES	Signal d'Exportation Nucléaire
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-B
NK	Natural Killer
NLC	Nurse like cells
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
NR	Non Répondeur
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaires
PB	Cellules B Péritonéales
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
Pc	Paracortex
PH	Pleckstrine Homology domain
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate
PKB	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PLC $\gamma$ 2	PhosphoLipase C gamma 2
PNAd	Peripheral lymph node addressin
PR	Domaine riche en prolines
pre-B	Précurseur des cellules B
pro-B	Progéniteur des cellules B
PTPN6	Protéine Tyrosine Phosphatase, Non-receptor Type 6
R	Répondeur
RAG	Recombination activating gene
RE	Reticulum endoplasmique
RL	Radeaux lipidiques
R/R	Patients LLC réfractaires ou en rechute
S	Switch
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PR1	Récepteur 1 de la Sphingosine-1-phosphate
SCL	Lymphomes à petites cellules

SCS	Sinus sous-capsulaire
SDF-1	Stromal cell Derived Factor 1
SFK	Src Family Kinases
SH2	Src Homology 2
SHARK	SH2 domain Ankyrin Repeat Kinase
SHIP	Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase
SHM	Somatic Hypermutation
Shp1	Src homology 2 domain-containing phosphatase 1
SLC	Surrogate Light Chain
SLP-65	Adaptor protein SH2 domain-containing Leucocyte Protein of 65 kDa
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
ST-HSC	Short Term-Hematopoietic Stem Cell
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
K396R	Syk mutée: lysine 396 remplacée par une arginine
TCR	Récepteur des Cellules T
T <sub>FH</sub>	Cellule T Folliculaire Helper
TH	Tec Homology domain
TIM	triosephosphate isomerase
TKB	Tyrosine Kinase Binding
TNF	Tumor necrosis factor
UM	Unmutated
VEGF	Vascular endothelial growth factor
V <sub>H</sub>	Variable Heavy
V <sub>H</sub> DJ <sub>H</sub>	Variable (Heavy) Diversité Jonctionnelle (Heavy)
V <sub>L</sub>	Variable Light
VLA-4	Very Late Antigen-4
V <sub>L</sub> J <sub>L</sub>	Variable (Light) Jonction (Light)
Y317	Tyrosine en position 317
ZAP 70	Zeta-chain-Associated Protein kinase of 70 kDa
ZF	Zinc Finger



# INTRODUCTION

## I. HOMEOSTASIE DES CELLULES B ET RECEPTEUR A L'ANTIGENE

Les lymphocytes B (Bursal ou Bone-marrow-derived Lymphocyte) sont des acteurs majeurs du système immunitaire. Leur expansion et leur survie au cours du développement hématopoïétique reposent sur l'acquisition progressive d'un récepteur à l'antigène (BCR) capable de reconnaître avec une haute spécificité un antigène donné et de produire des anticorps, ou immunoglobulines (Ig), capables de le neutraliser, tout en éliminant les lymphocytes auto-réactifs.

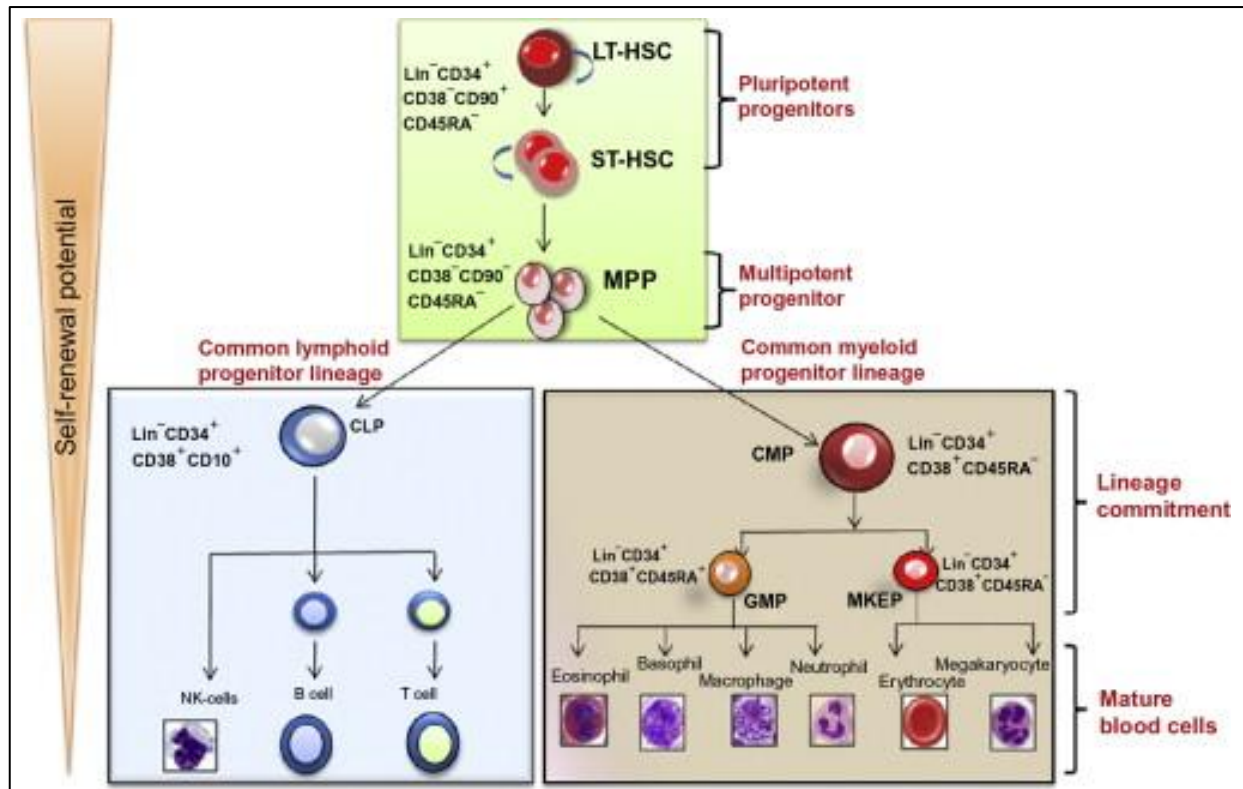
### I.1. Homéostasie au cours du développement

Comme toutes les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes dérivent des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les premières étapes de différenciation ont lieu dans la moelle osseuse avec une séparation entre lignages lymphoïde et myéloïde. Les étapes de la différenciation lymphoïde médullaire sont indépendantes de l'antigène. La poursuite de la différenciation et de la maturation s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires [1] et dépend, cette fois, de la présentation antigénique.

#### I.1.1. Hématopoïèse chez l'adulte

Les cellules souches hématopoïétiques: "Long-Term Hematopoietic Stem Cell" (LT-HSC) et "Short-Term HSC" (ST-HSC) sont des cellules primitives pluripotentes et possèdent une capacité d'auto-renouvellement. Les progéniteurs multipotents (MPP) qui en dérivent perdent leur capacité d'auto-renouvellement. Ils se différencient en progéniteurs communs unipotents à l'origine des lignages myéloïdes (Common Myeloid Progenitor (CMP)) et lymphoïdes (Common lymphoid Progenitor (CLP)).

Les CMP se différencient à leur tour en lignages phagocytaires (granuleux, dendritique et monocytaire), megacaryocytaires et érythrocytaire. Les CLP, progéniteurs des lignages lymphoïdes, seront à l'origine des lignages lymphocytaires T (lymphocytes T et cellules "Natural Killer" (NK)) et lymphocytaires B (*Figure 1*) [2].

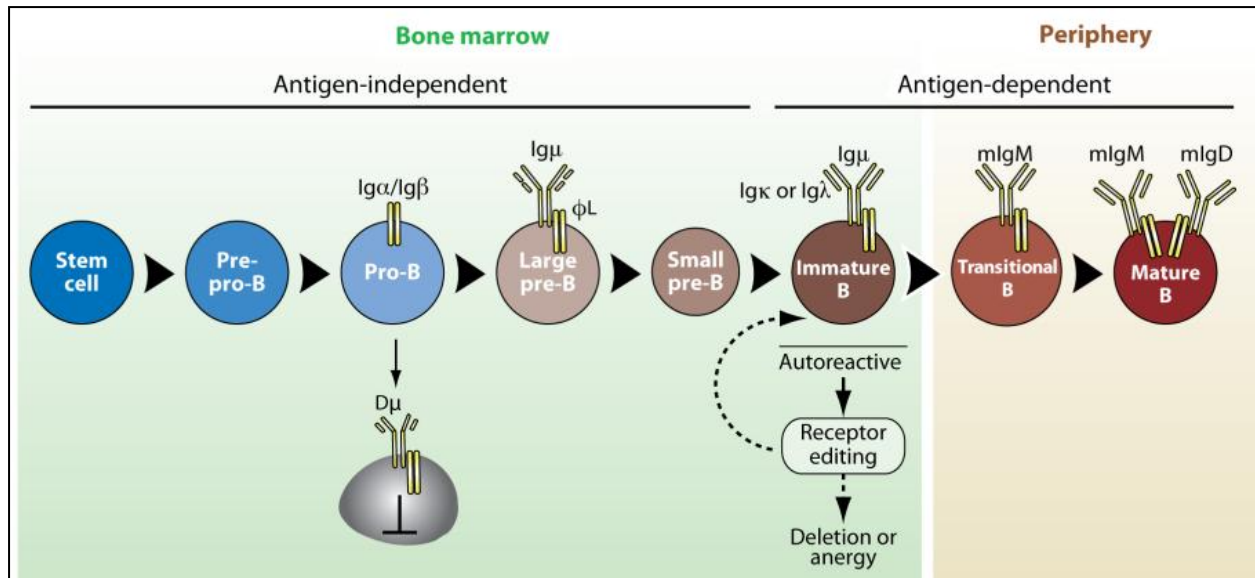


**Figure 1. Hiérarchie des cellules hématopoïétiques humaines et marqueurs de surface (Wasnik et al., 2012) [3].** Une échelle simplifiée de la hiérarchie cellulaire est décrite dans la figure. LT-HSC: Long-Term HSC; ST-HSC: Short-Term HSC; MPP: MultiPotent Progenitor; CLP: Common Lymphoid Progenitor; NK: Natural Killer; CMP: Common Myeloid Progenitor; GMP: Granulocyte-Monocyte Progenitor; MKEP: MegaKaryocyte-Erythrocyte Progenitor.

### I.1.2. Différenciation de la lignée B

Au-delà du stade CLP, les cellules du lignage lymphocytaire B subissent un long processus de différenciation soumis à l'expression de nombreux facteurs transcriptionnels et récepteurs membranaires afin d'aboutir, dans la moelle, à une cellule B immature exprimant un récepteur à l'antigène (BCR) fonctionnel (Figure 2) [4, 5].

Les études initiales visant à définir les étapes du développement des cellules B ont plus été réalisées chez la souris mais, plus récemment, celles-ci ont aussi été réalisées sur des cellules B humaines [1].



**Figure 2. Schéma de différenciation des cellules B (Kurosaki et al., 2010) [5].** Les différentes étapes de la lymphopoïèse B ainsi que du réarrangement des gènes des chaînes lourdes ( $Ig\mu$ ) et légères ( $IgL \kappa$  ou  $\lambda$ ) des immunoglobulines sont présentées. Les étapes qui se déroulent dans la moelle osseuse sont indépendantes de l'antigène alors que les étapes de maturation périphérique sont dépendantes de l'antigène.

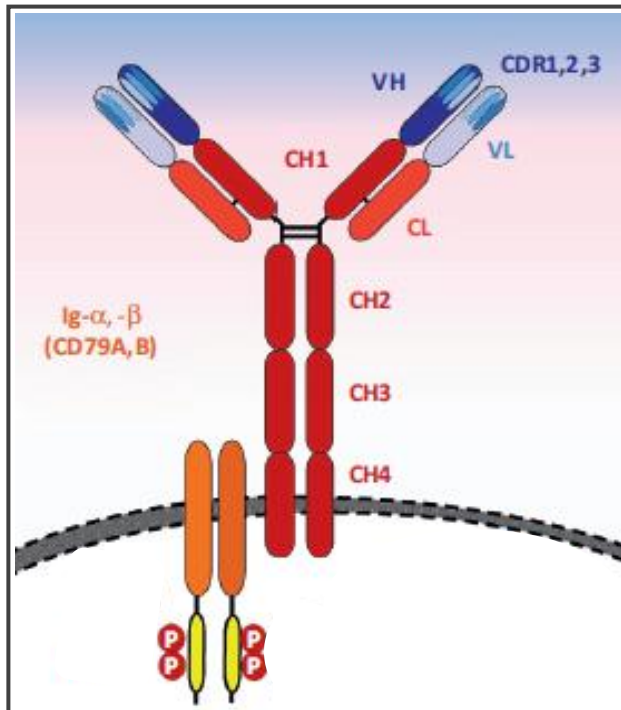
Les CLP expriment les marqueurs de surface CD34, CD38 et CD10. Ces cellules initient la transcription du CD79a, une des chaînes de signalisation du BCR mais ne l'expriment pas à la surface. La croissance des cellules est, à ce stade, sous la dépendance de l'interleukine 7. C'est au stade des cellules pro-B ( $CD34^+ CD10^+ CD19^+ CD20^+$ ) que les chaînes CD79a et b (ou  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ ) seront alors exprimées à la membrane en même temps que le CD19. L'immunoglobuline qui va constituer le récepteur à l'antigène avec ces deux chaînes de signalisation CD79a et b va, au cours de cette maturation, subir de profonds remaniements sur l'ensemble des chaînes lourdes et légères [4].

### I.1.2.1. Maturation des cellules B dans la moelle osseuse

La moelle osseuse est donc le site de production de cellules B naïves matures à partir des cellules progéniteurs. Cette maturation est indépendante de l'antigène et permet le réarrangement séquentiel des gènes constituant l'immunoglobuline. Cette dernière est constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères assemblées par des ponts disulfures. Les chaînes légères ont une masse d'environ 25 kDa tandis qu'une chaîne lourde avec 3 domaines CH a une masse d'environ 55 kDa [6]. Chaque chaîne est elle-même constituée d'un domaine constant (C) et d'un domaine

variable (V) (*Figure 3*). La région variable des chaînes lourdes est composée des régions Variable (V), Diversité (D) et Jonctionnelle (J) ( $V_H D J_H$ ), alors que la région variable des chaînes légères ne comporte que les régions V et J ( $V_L J_L$ ) [7]. Chaque région variable est divisée en une partie hypervariable comprenant 3 segments CDR, 1, 2 et 3, qui juxtaposés entre une chaîne lourde et une chaîne légère créent le site de liaison à l'antigène ou paratope [8] et une partie constante comprenant 4 segments FR (framework region) [6].

Les sous-unités  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  forment un hétérodimère associé de façon non covalente. Chaque sous-unité contient, dans sa partie cytoplasmique, un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) dont la séquence contient deux résidus tyrosines phosphorylables nécessaires à la signalisation du BCR. Les motifs ITAM sont responsables d'un signal basal du BCR qui permet la survie des cellules B même en absence d'antigène [9].



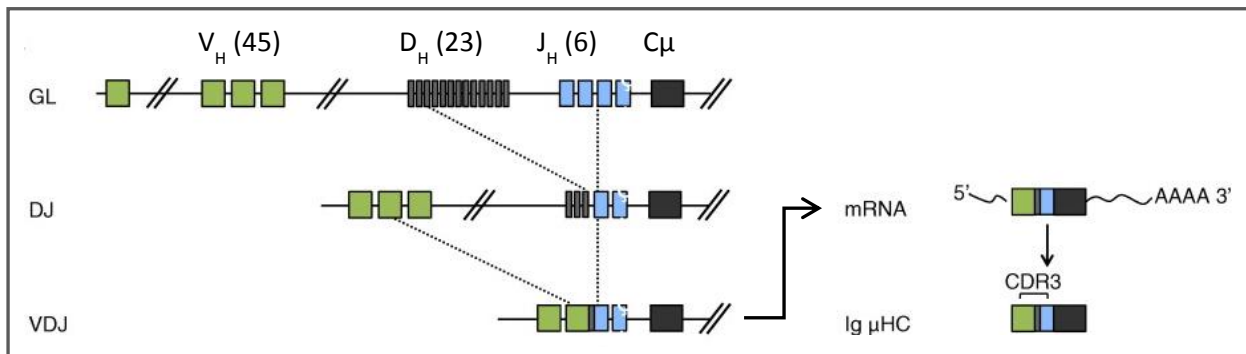
**Figure 3. Structure globale du BCR (Burger et Chiorazzi, 2013) [10].** Le pré-BCR et le BCR sont composés d'une immunoglobuline de surface et de deux sous-unités  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ . L'Ig est elle-même composée de deux chaînes lourdes comprenant chacune des régions constantes (CH1-4) et une région variable (VH) et de deux chaînes légères comprenant chacune une région constante (CL) et une région variable (VL). Les régions hypervariables liant l'anticorps sont appelées CDR3 (Complementary Determining Region-3).

#### 1.1.2.1.1. Réarrangement des chaînes lourdes et assemblage du pré-BCR

Les processus de recombinaison qui touchent à la fois les loci des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines permettent de constituer un large répertoire immunitaire [11].

## Réarrangement $V_H D J_H$

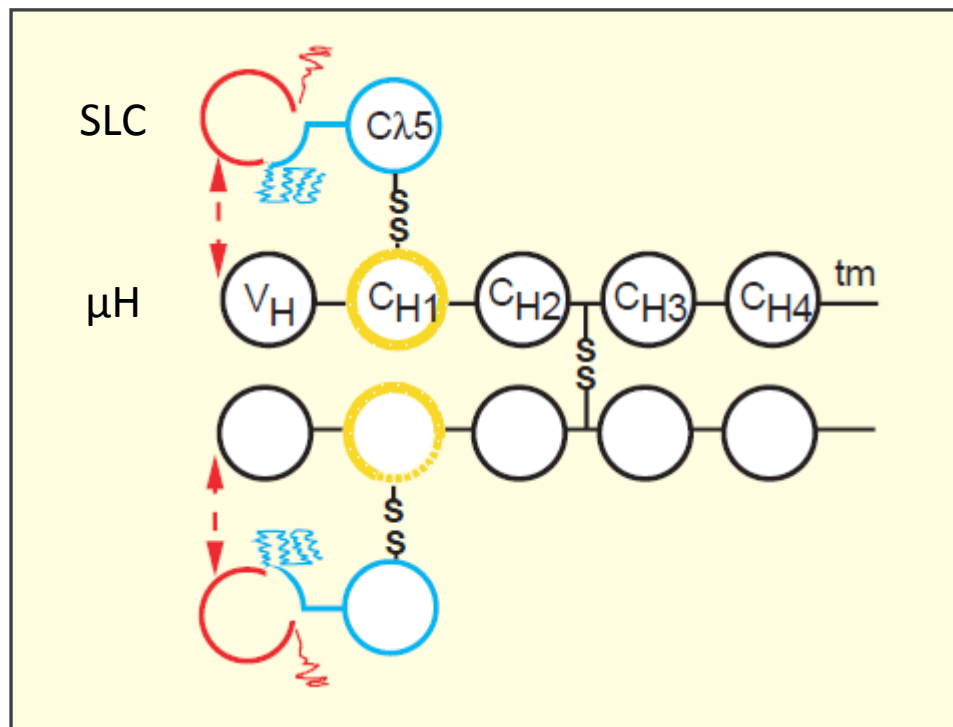
Le gène codant les chaînes lourdes des immunoglobulines est porté par le chromosome 14 humain. Il contient environ 45 segments  $V_H$ , 23 segments  $D_H$  et 6 segments  $J_H$  suivis des segments constants. Les premiers réarrangements font intervenir une recombinaison de l'ADN au stade pro-B à l'aide des protéines Rag1 et Rag2 (recombination activating gene) qui clivent l'ADN au niveau de séquences signal spécifiques. Dans un premier temps, le réarrangement consiste à joindre un segment D à un segment J avec excision des régions ADN intermédiaires. Un second réarrangement entre un segment V et le complexe DJ est alors effectué (Figure 4). Si le réarrangement est fonctionnel, une chaîne lourde d'isotype  $\mu$  est synthétisée et tout autre réarrangement du locus de la chaîne lourde est stoppé. Ainsi, seule l'Ig d'un des deux allèles parentaux est exprimée (processus d'exclusion allélique) [7, 12, 13].



**Figure 4. Structure du gène codant les chaînes lourdes du récepteur à l'antigène et processus de réarrangement VDJ (adapté de Martensson et al., 2010) [7].** Le schéma représente la structure du gène codant les chaînes lourdes des Ig à l'état non fonctionnel (Germline (GL)) ainsi qu'aux différentes étapes du réarrangement DJ puis VDJ puis la structure de l'ARNm et de la protéine Ig  $\mu$ H.

## Assemblage du pre-BCR

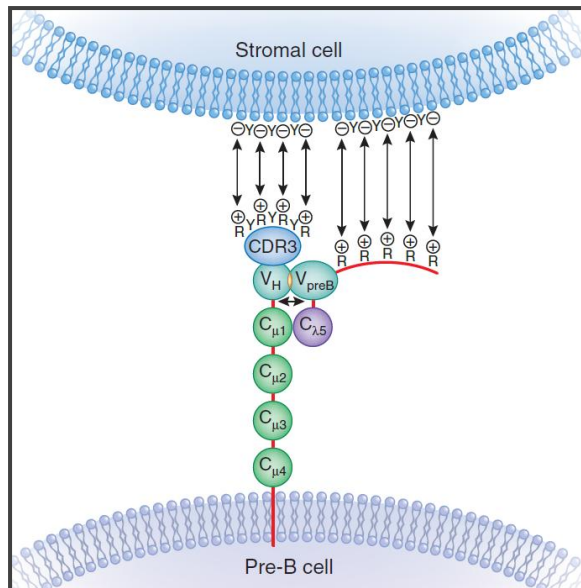
La chaîne lourde intracellulaire s'associe à une pseudo-chaîne légère ou "Surrogate Light Chain" (SLC) composée de deux protéines VpreB et  $\lambda 5$ . La protéine  $\lambda 5$  se compose de 3 domaines remarquables, la région N-terminale qui ne ressemble pas à une Ig ni à aucune autre protéine connue, la région centrale qui présente une forte homologie avec la région J des chaînes  $\lambda L$  et la région C-terminale qui présente un domaine d'homologie aux Ig ( $C\lambda 5$ ) similaire aux régions constantes des chaînes  $\lambda L$  et qui s'associe à la première région du domaine constant ( $C_{H1}$ ) des chaînes  $\mu H$  par un pont disulfure. L'assemblage des deux chaînes  $\mu H$  avec la SLC et les deux sous-unités  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  permet l'expression membranaire d'un récepteur pre-BCR (Figure 5) [14].



**Figure 5. Modèle d'assemblage du pré-BCR (Melchers et al., 2000) [14].** La pseudo-chaine légère (SLC) s'associe aux chaînes lourdes ( $\mu H$ ) en créant un pont disulfure S-S entre la région C $\lambda 5$  et la première région du domaine constant (C $H1$ ).

### Sélection positive

Une fois le pré-BCR assemblé, seules les cellules exprimant un pré-BCR fonctionnel capable de transduire les signaux vont progresser au-delà de ce point de contrôle (environ 55% des cellules). Pour cela, après assemblage avec les SLC et expression à la membrane, la portion non Ig de la protéine  $\lambda 5$  (ligne rouge sur la [Figure 6](#)), riche en arginines et donc chargée positivement interagit avec les tyrosines ou autres molécules chargées négativement à la surface des cellules stromales voisines. Les régions variables CDR3 (Complementary Determining Region-3) des chaînes  $\mu H$  peuvent également contenir des résidus arginines ou encore des résidus tyrosines qui interagissent avec des charges opposées à la surface des cellules stromales. Ainsi, l'interaction avec les cellules stromales initie la signalisation du pre-BCR, les cellules transitent du stade pre-BI au stade large pre-BII et une étape de prolifération se met en place. Dans le cas où le pre-BCR formé n'est pas fonctionnel, le signal de prolifération n'est pas transmis et les cellules qui ne sont pas sélectionnées meurent par apoptose [7, 15].



**Figure 6. Initiation du signal induit par le pre-BCR (Von Boehmer et al., 2010) [15].** Le domaine  $V_H$  de la chaîne lourde ( $\mu H$ ) s'associe avec le domaine  $V_{preB}$  de la pseudo-chaîne légère (SLC) par un contact classique  $V_H-V_L$ . La portion  $\lambda 5$  de la SLC riche en arginine (ligne rouge) interagit avec les résidus de charge opposée présentés par les cellules stromales. Ces interactions activent le pre-BCR et induisent une signalisation.

### 1.1.2.1.2. Réarrangement des chaînes légères et assemblage du BCR

L'étape de prolifération qui s'en suit sur plusieurs cycles permet un agrandissement de la population et la génération de multiples cellules pre-B, au stade small pre-B, identiques. Chacune d'elles pourra alors avoir un réarrangement différent des gènes de la chaîne légère. Il y a alors arrêt de l'expression de la pseudo-chaîne légère et disparition du récepteur pré-B à la surface [5].

#### Réarrangement $V_L J_L$

De la même manière que les cellules pre-BI ont procédé au réarrangement des segments VDJ du gène codant les chaînes  $\mu H$ , les cellules small pre-BII procèdent au réarrangement des gènes codant les chaînes légères, tout d'abord sur le locus  $\kappa$ , et s'il n'y a pas eu de réarrangement  $\kappa$  fonctionnel, sur le locus  $\lambda$ . Les deux loci contiennent des segments V et J mais pas de segment D.

Le gène codant les chaînes  $\kappa$  contient environ 35 segments  $V_\kappa$  et 5  $J_\kappa$  situés sur le chromosome 2 humain. Le gène codant les chaînes  $\lambda$  contient 30 segments  $V_\lambda$  et 4 segments  $J_\lambda$  situés sur le chromosome 22. Quelle que soit la chaîne légère produite, elle va s'associer à la chaîne  $\mu$  et former un récepteur à l'antigène IgM complet à la membrane. La présence de deux gènes permet donc une augmentation des associations fonctionnelles  $\kappa$  ou  $\lambda$  ( $35 V_\kappa \times 5 J_\kappa + 30 V_\lambda \times 4 J_\lambda$ ). Grâce au mécanisme de recombinaison avec les protéines Rag1 et Rag2, un allèle peut subir plusieurs réarrangements successifs et produire une chaîne légère compatible avec la chaîne  $\mu H$  déjà formée. Le récepteur formé délivre, à nouveau, des signaux de prolifération amplifiant

seulement les cellules qui ont des récepteurs à l'antigène complets. En effet, de même que pour les chaînes lourdes, la cellule exprime un seul type de chaînes légères et a recours, une seconde fois, au processus d'exclusion allélique. L'IgM ainsi formée et les sous-unités  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  associées constituent le BCR qui va être exprimé à la surface et permettre la transition des cellules small pre-B au stade B immature. A nouveau, les cellules pour lesquelles il n'y a pas eu de réarrangement fonctionnel sont éliminées [13, 14, 16].

### **Sélection négative**

Les cellules B immatures exprimant une IgM de surface sont les premières cellules de la lignée B capables de reconnaître et répondre à un antigène *via* le BCR. Elles sont soumises à la sélection négative qui consiste à éliminer les cellules auto-réactives. Ainsi, si la cellule B reconnaît dans la moelle osseuse un antigène avec une forte affinité, sa maturation est stoppée. Elle est soit éliminée par apoptose, soit soumise à un nouveau processus de recombinaison des domaines V générant une nouvelle chaîne légère qui lui permet de changer la spécificité du récepteur. Ce processus de "Receptor Editing" (*Figure 2*) permet d'éliminer les lymphocytes réactifs aux antigènes du soi et génère un répertoire tolérant. Les cellules dont le récepteur persiste à être réactif au soi peuvent être inactivées; elles reconnaissent les auto-antigènes avec une faible affinité et le signal généré est insuffisant à la progression, on parle alors d'anergie (*Figure 2*). L'anergie est un état de non-réactivité d'une cellule B exposée à un antigène, provoquée par la modulation négative de l'IgM de surface et la modification du niveau basal de calcium. Cependant, il a été montré qu'il persiste environ 30% de cellules plus ou moins auto-réactives parmi les cellules B matures et qu'elles utilisent également le processus d'anergie pour survivre [17, 18].

Au cours du développement des cellules B humaines, beaucoup de cellules poly-réactives et la plupart des cellules auto-réactives sont éliminées lors de ce second point de contrôle. une défaillance à ce point de contrôle peut résulter en des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique ou la polyarthrite rhumatoïde [5, 13, 15, 19].

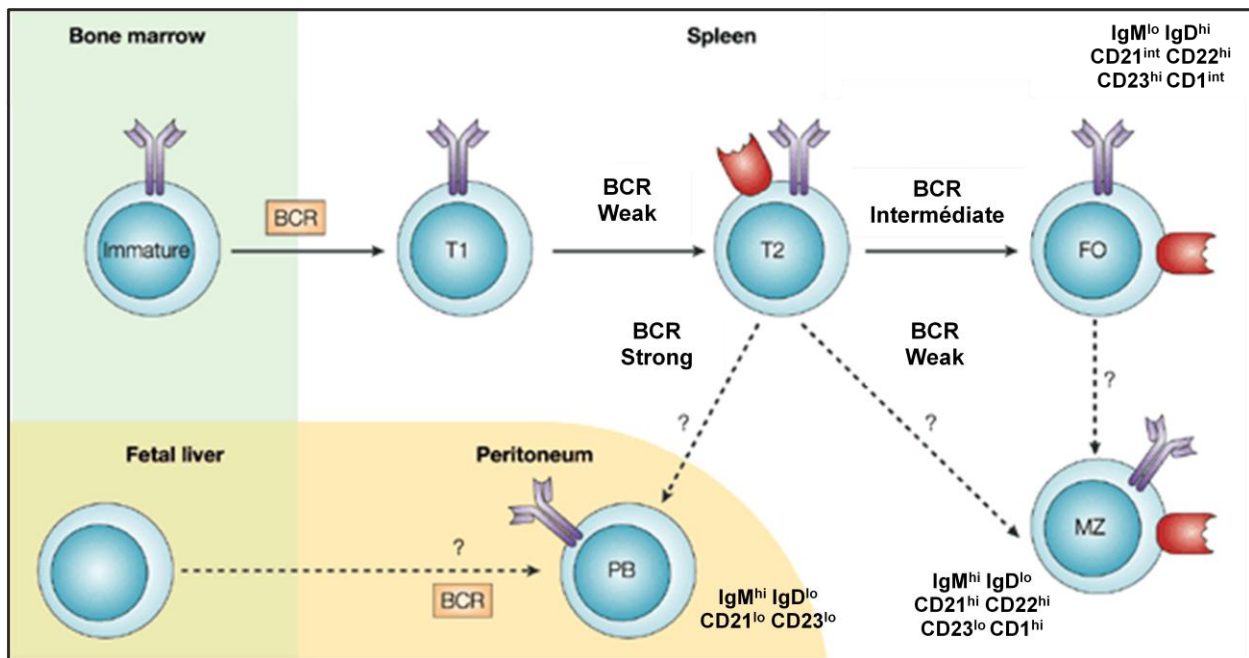
#### **I.1.2.2. Devenir des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires**

Les cellules dont le récepteur est fonctionnel et qui ont passé ce second point de contrôle quittent la moelle osseuse et vont alors migrer en périphérie, vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS), où se déroulent les phases terminales de la maturation. Cette phase est alors



dépendante de la présence d'antigènes étrangers. Ces cellules immatures sont naïves. Elles expriment une IgM et vont coloniser la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses non encapsulées. 90% des cellules de la moelle n'arrivent pas à ce stade. Ces cellules B sont transitoires.

Elles vont, par un mécanisme d'épissage, pouvoir produire à la fois des IgM et des IgD et donner des cellules B matures exprimant les deux isotypes, mais aussi du CD21 et du CD23 [19]. Ces cellules colonisent les OLS à la recherche de leur antigène spécifique et migrent vers des zones folliculaires B spécifiques. Les cellules qui ne rencontrent pas l'antigène dans un délai de 2 à 3 semaines meurent par apoptose. De plus, ces cellules vont, dès 24h, sortir des OLS et retourner vers la circulation [20].

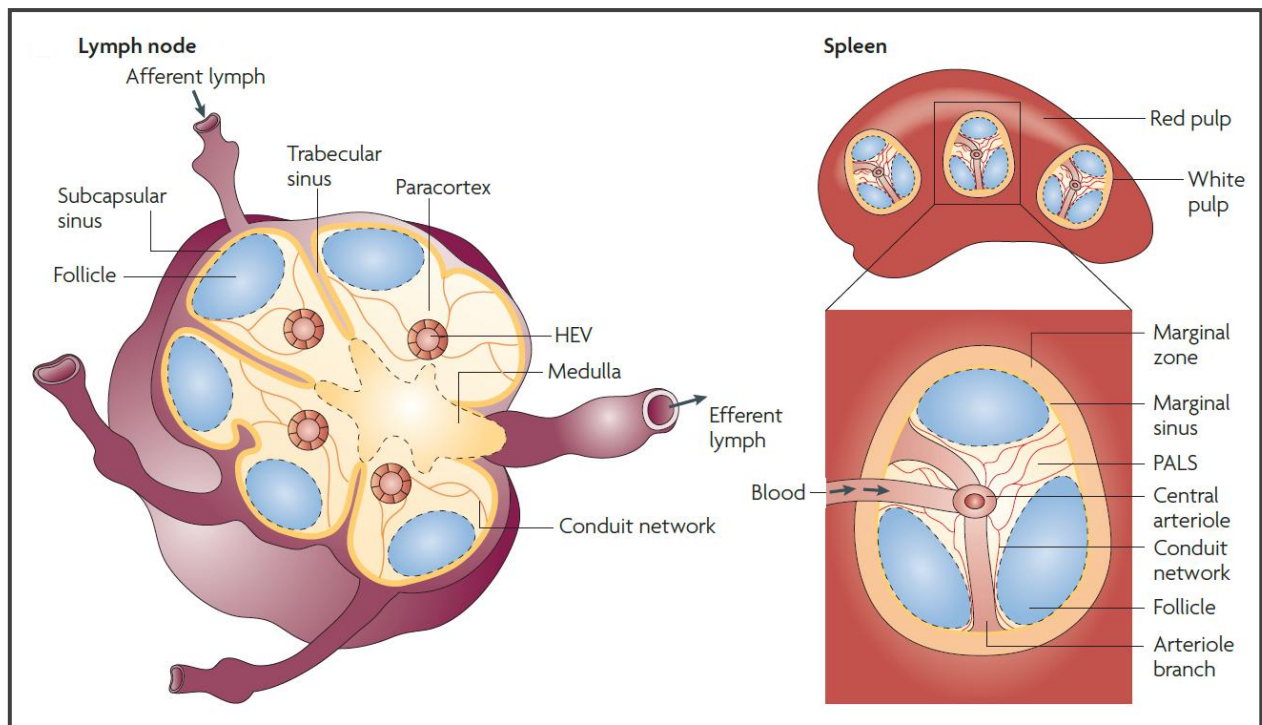


**Figure 7. Devenir des cellules B transitoires et matures (adapté de Niiri, 2002) [19].** Les cellules B immatures expriment un BCR et quittent la moelle pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires à la recherche de leur antigène spécifique. Ces cellules sont dans un état transitoire T1 et nécessitent un premier signal faible du BCR pour passer au stade T2. Différentes capacités de signalisation du BCR permettent ensuite aux cellules T2 de devenir matures. Les cellules B folliculaires (FO) nécessitent un signal intermédiaire, les cellules de la zone marginale (MZ) et péritonéales (PB) nécessitent respectivement des signaux faibles et forts.

Les cellules qui rencontrent l'antigène deviennent matures. Celles-ci se divisent en trois sous-groupes: les cellules B folliculaires (FO) communément appelées B2, les cellules B2 de la zone

marginale (MZ) et les cellules péritonéales (PB) dites aussi B1 (*Figure 7*). Les données actuelles montrent que la capacité de signalisation du BCR permet de distinguer les 3 sous-groupes: le développement des B1 requiert le plus fort signal, les B2 requièrent un signal intermédiaire et les MZ requièrent le plus faible signal. Une partie des cellules B1 péritonéales trouve également son origine dans le foie fœtal, lieu important d'hématopoïèse primitive [19].

Les cellules B auto-réactives vis-à-vis des antigènes du soi présents en périphérie et absents des organes lymphoïdes centraux sont proportionnellement plutôt retrouvés dans les populations MZ ou B1. Ces dernières ont en commun de répondre rapidement à un antigène, par une voie indépendante des cellules T [19, 21].



**Figure 8. Représentation schématisée d'un ganglion et de la rate (Batista et al., 2009) [22].** Le ganglion est organisé en 3 régions: la medulla, le paracortex (ou zone T) et les follicules (ou zone B). La rate est organisée en 2 régions: la pulpe rouge et la pulpe blanche comprenant le paracortex, les follicules B et la zone marginale.

### **Cellules B de la zone marginale de la rate**

Les cellules MZ sont une population de cellules B2 pour la plupart non-circulantes et concentrées dans la zone marginale de la rate, située à la frontière entre les pulpes blanche au

centre et rouge à l'extérieur. Elle est longée par le sinus marginal qui entoure lui-même les follicules et peut approvisionner la zone marginale en cellules. Des cellules B "MZ-like" sont également présentes dans la paroi interne du sinus sous-capsulaire (SCS) des ganglions (*Figure 8*). Les cellules MZ proviennent soit directement des cellules transitoires, soit de cellules B2 ayant un seuil d'activation bas (*Figure 7*) [23, 24].

### *Cellules B1 péritonéales*

Les cellules B1 représentent environ 5% du nombre total de cellules B et sont retrouvées dans la rate, l'intestin et les cavités pleurale et péritonéale. Elles expriment des marqueurs communs avec les autres cellules B tels que le CD19 ou le CD45R même si ce dernier est présent à un niveau plus bas que dans les cellules B-2. Les cellules B-1 péritonéales peuvent être identifiées par un phénotype IgM<sup>hi</sup> IgD<sup>lo</sup> CD11b<sup>+</sup> et peuvent également être divisées en deux sous-groupes en fonction de l'expression du CD5. D'un côté, les cellules B1a expriment du CD5 qui est normalement considéré comme un marqueur spécifique des cellules T et de l'autre, les cellules B1b qui sont CD5<sup>-</sup>. Leur origine reste encore controversée, certains travaux montrent qu'elles peuvent être issues de progéniteurs B pendant le développement embryonnaire auquel cas B1 et B2 proviennent de maturations distinctes. En effet, la population B1 est la population retrouvée au cours de l'embryogenèse, à 8 semaines de grossesse, dans le péritoine, où 40% des cellules sont CD5<sup>+</sup> et sont également abondantes chez le nouveau né. Elles sont également décrites comme dérivant des cellules transitoires exposées à une stimulation antigénique faiblement auto-réactive (*Figure 7*) ou à un pathogène commensal. Elles partagent alors des caractéristiques avec les cellules MZ [19, 23, 25]. Les cellules B1 sont, à ce titre, des effecteurs de l'immunité innée et répondent principalement à des antigènes indépendamment des cellules T. Les B1a sécrètent des IgM qui constituent une première ligne de défense contre des antigènes de type bactérien encapsulés, les cellules B1b produisent des anticorps qui auront un rôle dans l'élimination du pathogène et une protection à plus long terme [25].

### *Cellules folliculaires*

Les cellules B2 folliculaires représentent la population majoritaire de cellules B matures. Elles sont soit circulantes, soit dans les follicules de la rate et des ganglions (*Figure 8*). Nous verrons dans le chapitre suivant les étapes de leur maturation terminale en cellules B mémoires ou en plasmocytes sécréteurs [7].

## I.2. Régulation de l'homéostasie via le BCR

Le BCR est le récepteur à l'antigène spécifique des cellules B et la voie d'activation principale de ces cellules qui aboutit à la décision de survie ou de mort cellulaire en fonction du signal transmis. Il est le régulateur physiologique principal de l'homéostasie des cellules B. La maturation des lymphocytes B qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires est donc dépendante de l'antigène et de sa rencontre spécifique. Ces étapes vont comprendre une maturation du BCR afin de sélectionner les cellules B dont celui-ci a une affinité plus importante pour l'antigène (sélection positive) mais c'est aussi le lieu d'une sélection négative des cellules B auto-réactives vis-à-vis des antigènes du soi présents en périphérie et absents des organes lymphoïdes centraux.

### I.2.1. Maturation folliculaire

En fonction du lieu de rencontre des cellules B activées avec l'antigène, soit elles produisent rapidement des IgM de faible affinité, soit elles forment des centres germinatifs (CGs) où elles vont subir une hypermutation somatique et générer des anticorps de très haute affinité [26]. Après entrée dans les follicules, les cellules B naïves migrent au sein du réseau folliculaire où elles vont rencontrer leur antigène spécifique *via* des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et achever leur maturation.

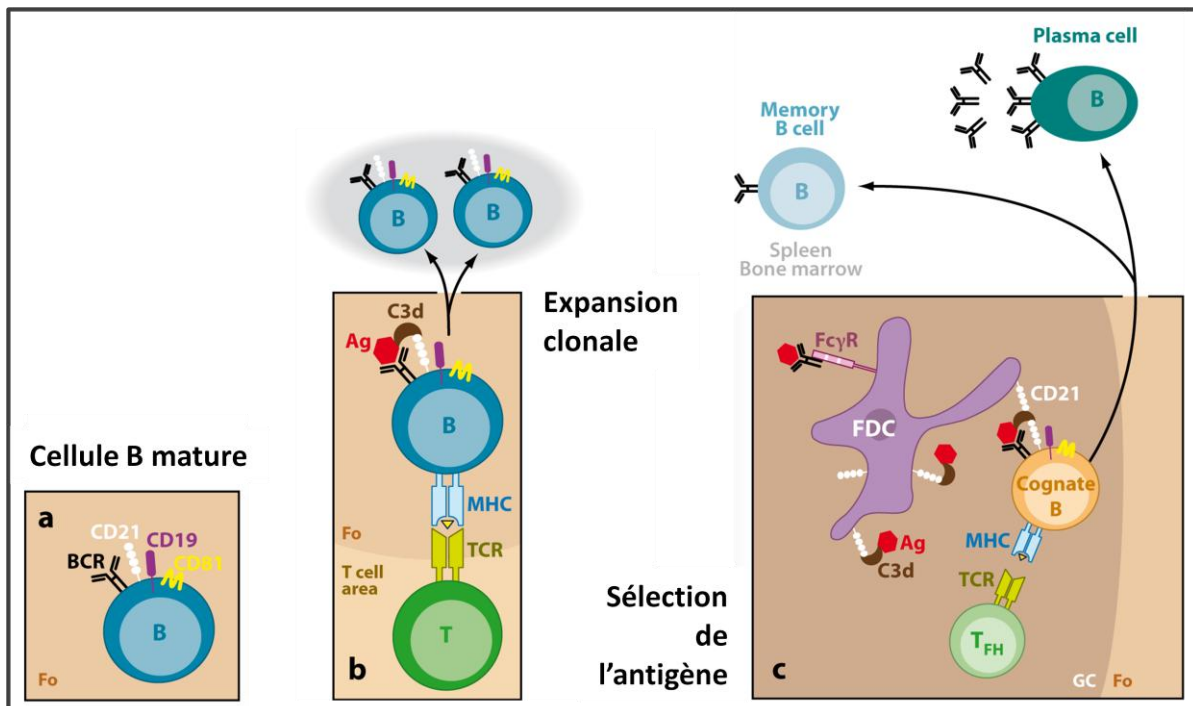
#### I.2.1.1. Présentation de l'antigène

L'activation des cellules B est initiée par la liaison d'un antigène au BCR. Les cellules B peuvent reconnaître et répondre à des antigènes soit solubles, soit associés à la membrane de CPA. Il est aujourd'hui accepté que la forme la plus efficace à initialiser l'activation des cellules B est celle présente à la surface membranaire [26]. Pour une première reconnaissance, les cellules B ont besoin de CPA.

Les cellules B naïves expriment des IgD et des IgM ainsi que des récepteurs du complément, le CD21 et le CD35 (CD21 dans la *Figure 9.A*) qui forment un co-récepteur avec le CD19 et le CD81. Lorsque le BCR d'une cellule B naïve reconnaît son antigène spécifique dans les follicules, la cellule internalise le complexe, dégrade l'antigène protéique en peptides puis présente l'un de ces peptides antigéniques à sa surface *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Elle présente le peptide antigénique au récepteur des cellules T, le TCR (*Figure 9.B*).

La reconnaissance entre cellules T et B est renforcée par l'interaction entre le récepteur CD40 exprimé constitutivement à la surface des cellules B et son ligand CD40L exprimé à la surface des cellules T activées. Les cellules B activées prolifèrent et donnent naissance à une structure spécialisée appelée centre germinatif (CG) (*Figure 9.C*) [5, 27].

Les cellules B matures expriment également, à niveaux élevés, les intégrines LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) et VLA-4 (Very Late Antigen-4) à leur surface. L'interaction de LFA-1 avec son ligand ICAM (intercellular adhesion molecule), exprimé à la surface des CPA (les FDC (Follicular Dendritic Cell) pour les cellules B), empêche l'apoptose des cellules B dans les centres germinatifs. Durant l'activation des cellules B, les intégrines ont pour rôle de promouvoir l'adhérence cellulaire et de ralentir l'inactivation de la signalisation des microclusters [5, 26].



**Figure 9. Présentation de l'antigène et différenciation des cellules B (adapté de Gonzalez et al., 2011) [27].** A. Les cellules B matures sont situées dans les follicules et expriment les récepteurs du complément CD21/35 qui forment un co-récepteur avec CD19 et CD81. B. Les cellules B activées se lient et présentent l'antigène aux cellules T et subissent l'hypermutation somatique et la commutation de classe des immunoglobulines. C. Elles forment alors les centres germinatifs et présentent l'antigène aux cellules T helper folliculaires (T<sub>FH</sub>). Suite à la rencontre des cellules B avec l'antigène et les cellules T<sub>FH</sub>, les cellules B se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoires.

## *Centres germinatifs*

Une caractéristique générale de la réponse des cellules B à un antigène présenté par les cellules T est la formation de CG 3-4 jours après l'exposition à l'antigène. Les CG sont divisés en deux zones: une claire et une sombre. La zone claire est proche du SCS et de la MZ, ce qui peut favoriser l'entrée de cellules B naïves ou d'antigènes. Elle est occupée par des FDC présentatrices d'antigènes et des centrocytes. La zone sombre est une zone occupée plutôt par les centroblastes.

Lors de la formation des CG, les cellules se retrouvent d'abord dans la zone claire puis passent rapidement dans la zone sombre où elles se divisent rapidement, elles sont au stade centroblastes. Elles subissent la commutation de classe des Ig (CSR) et la SHM et sortent du cycle cellulaire devenant alors des centrocytes. Elles retournent dans la zone claire où les FDC vont leur présenter des antigènes pour la sélection clonale. Cependant, si les divisions cellulaires et la sélection clonale se font préférentiellement dans la zone claire, les cellules B peuvent se diviser et sélectionner l'antigène dans les deux zones.

### **I.2.1.2. Changements génétiques du BCR**

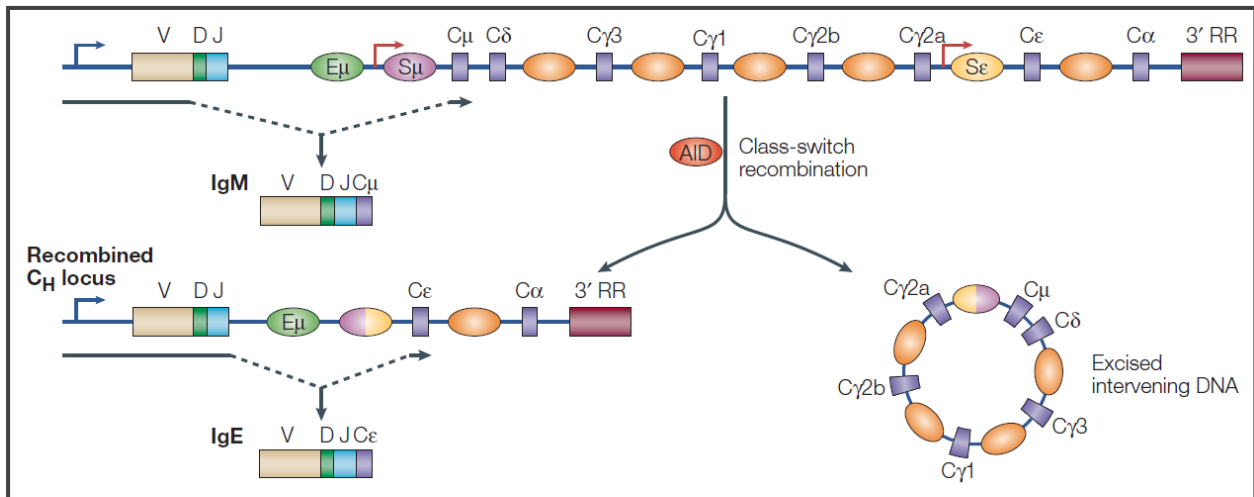
Au niveau des centres germinatifs, les BCR des cellules B stimulées par un antigène subissent deux nouvelles modifications génétiques qui requièrent la même enzyme, spécifique des cellules B activées, l'AID (activation-induced cytidine deaminase) [28].

#### ***I. 2.1.2.1. Hypermutation somatique***

L'hypermutation somatique (SHM) est un processus génétique par lequel vont être introduits des mutations ponctuelles au hasard et à niveaux élevés ( $10^6$  fois plus que la normale) dans les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères des Ig permettant aux cellules B d'exprimer des BCR de haute affinité pour les antigènes [29]. Ce processus introduit des mutations ponctuelles dans les régions déjà réarrangées qui vont ainsi modifier l'affinité de liaison à l'antigène. Les cellules B dont le BCR présente une maturation d'affinité pour l'antigène seront sélectionnées positivement et poursuivront leur différenciation, soit en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, soit en cellules mémoires qui permettent une réponse secondaire plus rapide et plus efficace.

### 1.2.1.2.2. Commutation de classe des Ig

La commutation de classe des Ig (CSR) est un processus génétique par lequel les exons codants pour les régions constantes des chaînes lourdes ( $C_H$ ) des IgM initiales  $C_\mu$  vont être remplacés par des exons codants pour des régions constantes  $C_\gamma$ ,  $C_\alpha$  ou  $C_\epsilon$  qui aboutiront à l'expression d'isotypes IgG, IgA ou IgE. La région variable et donc l'affinité pour l'antigène n'est alors pas modifiée mais les nouveaux isotypes permettent d'associer, à un même épitope, des fonctions effectrices différentes.



**Figure 10. Réarrangement des régions constantes du gène codant pour les chaînes lourdes des Ig (Chaudhuri et al., 2004) [28].** L'isotype M est remplacé par de nouveaux isotypes (E sur le schéma) après transcription du segment constant correspondant ( $C_\epsilon$ ) marqué par la flèche rouge.

Le mécanisme de CSR ressemble quelque peu au réarrangement VDJ en cela qu'il consiste en une excision d'une partie d'ADN pour en fusionner deux autres mais fait appel aux enzymes AID. Le gène murin contient 8 segments codants ( $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\gamma3$ ,  $C_\gamma1$ ,  $C_\gamma2b$ ,  $C_\gamma2a$ ,  $C_\epsilon$  et  $C_\alpha$ ) pour des fragments constants  $C_H$ . La CSR nécessite des cassures double-brins de l'ADN au niveau de régions S (switch) qui précèdent chaque segment  $C_H$  excepté le segment  $C_\delta$  et nécessite les mécanismes de réparation des cassures double-brins entre deux régions S (dont  $S_\mu$ ). Des cytokines sont à l'origine du choix du gène  $C_H$  transcrit (flèches rouges sur la *Figure 10*) et déterminent l'isotype qui va remplacer l'IgM. L'ADN est excisé sous forme d'épisme [28].

Il existe 5 classes différentes d'Ig: M, A, G, D et E, définies par les 9 isotypes possibles pour les régions constantes de leurs chaînes lourdes. Ainsi, les IgM sont constituées d'une  $Ig_\mu$ , les IgD d'une  $Ig_\delta$ , les IgE d'une  $Ig_\epsilon$ , les IgA d'une  $Ig_{\alpha1}$  ou  $\alpha2$  et les IgG d'une  $Ig_{\gamma1}$ ,  $\gamma2$ ,  $\gamma3$  ou  $\gamma4$ . Les fragments

constants sont divisés en 3 (IgG, IgA, IgD) ou 4 (IgM, IgE) segments  $C_H$  qui spécifient la fonction effectrice de l'Ig. Les IgG sont les Ig les plus abondantes chez l'homme car elles ont un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre les bactéries et les virus. Elles interviennent dans l'opsonisation, dans l'activation du complément et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps. Les IgA interviennent dans l'immunité des muqueuses (digestives et respiratoires par exemple) et les IgE interviennent dans la défense antiparasitaire, l'hypersensibilité immédiate et l'activation des mastocytes. IgM et IgD, les premières Ig formées, sont les récepteurs à l'antigène des cellules B naïves. Les IgM activent le complément [30].

### **I.2.1.3. Sélection clonale et homéostasie *via* le BCR**

Lors de la sélection clonale, les cellules B activées doivent rencontrer leur antigène spécifique, présenté par les FDC et maintenir l'activation grâce à des cellules T helper folliculaires ( $T_{FH}$ ) jusqu'à leur différenciation en cellules B mémoires à long terme ou en plasmocytes (*Figure 9.C*). Les cellules B exprimant les BCR de plus hautes affinités peuvent accumuler plus d'antigènes et recruter d'avantage de cellules T helper spécifiques à leur développement. Si les cellules B activées ne rencontrent pas leur antigène spécifique, elles échouent à déclencher un signal *via* le BCR et meurent par apoptose. Si elles rencontrent l'antigène spécifique, elles reçoivent un signal de survie notamment au travers d'une signalisation *via* BAFF (B cell-activating factor) par les FDC et déclenchent un signal BCR qui va réguler leur survie à long terme [27].

### **I.2.2. Trafic ganglionnaire**

Les cellules B2 folliculaires qui sortent de la moelle n'ont pas encore rencontré l'antigène et sont dites naïves. Ces cellules naïves colonisent les nombreux (~450) ganglions du corps humain et peuvent migrer plusieurs heures au sein du réseau folliculaire avant de rencontrer leur antigène spécifique présenté par les FDC [20, 31].

#### ***Structure du ganglion***

Le ganglion a une architecture hautement organisée avec les zones de la medulla au centre et le cortex à la périphérie. Le cortex comprend lui-même 2 zones: les follicules riches en cellules B et le paracortex, autour des follicules, riche en cellules T et en vaisseaux HEV (High Endothelial Venules) par lesquels les lymphocytes peuvent entrer dans les ganglions (*Figure 8*). Le ganglion est



également irrigué par des vaisseaux lymphatiques: vaisseau afférent pour l'entrée suivi d'un réseau organisé complexe de sinus qui se rejoignent au niveau de la medulla où le liquide lymphatique est filtré avant d'être drainé par le vaisseau efférent [26].

### *Acteurs cellulaires*

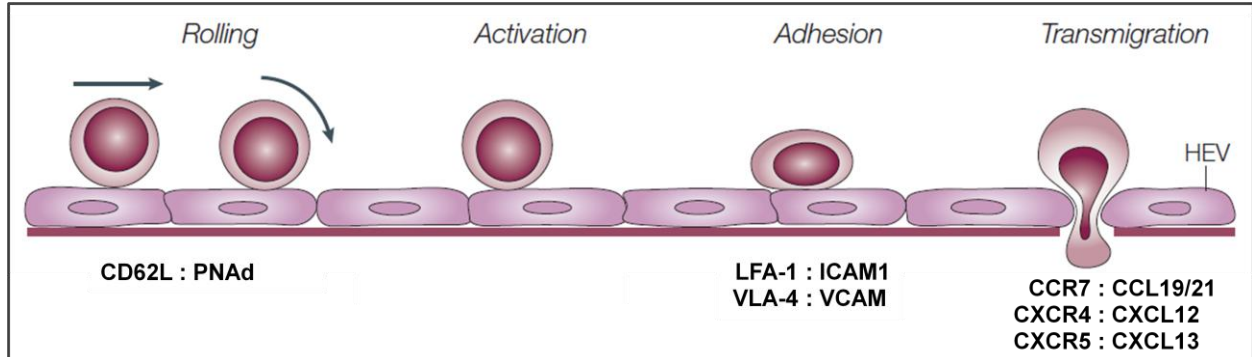
Les ganglions sont un carrefour entre les réseaux vasculaire et lymphatique qui permettent la rencontre entre les antigènes qui proviennent de la lymphe et les lymphocytes qui arrivent du sang. Les ganglions sont le siège d'un réseau cellulaire important. Ainsi, la medulla est riche en cellules phagocytaires dont les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Outre les cellules hématopoïétiques, le cortex est constitué de cellules résidentes, les cellules stromales. On distingue en particulier les cellules dendritiques folliculaires (FDC) qui présentent l'antigène aux cellules B et les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) qui forment un réseau de fibres réticulaires riches en collagène important pour la migration des cellules immunitaires. Les FDC résident donc préférentiellement dans les follicules au contact des lymphocytes B alors que les FRC occupent le paracortex, formant un réseau de circulation des lymphocytes T et des DC qui arrivent du sang *via* les HEV formées par des cellules endothéliales spécialisées, les Blood Endothelial Cells (BEC) [27].

#### **I.2.2.1. Entrée dans les ganglions**

La migration des cellules B du sang vers le ganglion s'appelle le "homing", elle se déroule en plusieurs étapes: le roulement (rolling), l'arrêt divisé en une étape d'activation et une étape d'adhérence et l'extravasation (transmigration) (*Figure 11*). Ces étapes vont permettre aux cellules B de migrer, d'adhérer, puis de traverser les HEV, leur principale voie d'entrée.

L'interaction des cellules B avec les HEV est initiée par un récepteur de type L-selectine exprimé par les cellules B, le CD62L, qui reconnaît des glycoprotéines sulfatées exprimées spécifiquement par les HEV telles que la PNAd (peripheral lymph node addressin). Ces interactions faibles permettent aux lymphocytes de rouler le long des HEV (étape dite de rolling) à la recherche d'un site pour traverser les BEC. La seconde étape consiste en un arrêt de cette migration par une adhérence plus ferme grâce à l'interaction forte entre les intégrines (VLA-4 et LFA-1) exprimées par le lymphocyte et leurs ligands respectifs (VCAM et ICAM) sur les BEC. La traversée de l'endothélium est régulée par les interactions entre les récepteurs de chimiokines exprimés à la surface des cellules B et leurs chimiokines respectives: CCR7 avec CCL19/21 exprimés par les HEV,

CXCR4 avec CXCL12, ou SDF-1 (Stromal cell-derived factor), un couple également très important dans la moelle et CXCR5 avec CXCL13, produit plus spécifiquement par les cellules stromales ganglionnaires (FDC et FRC) [20, 32]. Plusieurs études montrent que le CXCR5 participe aussi à l'entrée des lymphocytes dans les tissus muqueux [33]. Les gradients de chimiokines assurent ainsi l'entrée des cellules B dans le ganglion. Enfin, la trans-migration des lymphocytes met en jeu un mécanisme de diapédèse à travers les jonctions inter-endothéliales [20, 32].



**Figure 11. Etapes d'entrée des lymphocytes dans les ganglions (adapté de Von Andrian, 2003) [32].** Les cellules B initient l'étape de roulement le long des vaisseaux HEV (High Endothelial Venules) par la liaison faible entre la L-selectine CD62L qu'elles expriment à leur surface et leur ligand PNAd (peripheral lymph node addressin) exprimé par les HEV. Une adhérence plus ferme entre les intégrines LFA-1 et VLA-4 exprimées par les cellules B et leurs ligands respectifs ICAM et VCAM exprimés par les HEV entraîne l'arrêt de la migration. Les cellules B exprimant les récepteurs CCR7, CXCR4 et CXCR5 traversent alors les HEV par un processus d'extravasation en suivant des gradients vers leurs ligands respectifs: le CCL19/21 exprimés par les HEV elles-mêmes et le CXCL12 et le CXCL13 exprimés par les cellules stromales ganglionnaires.

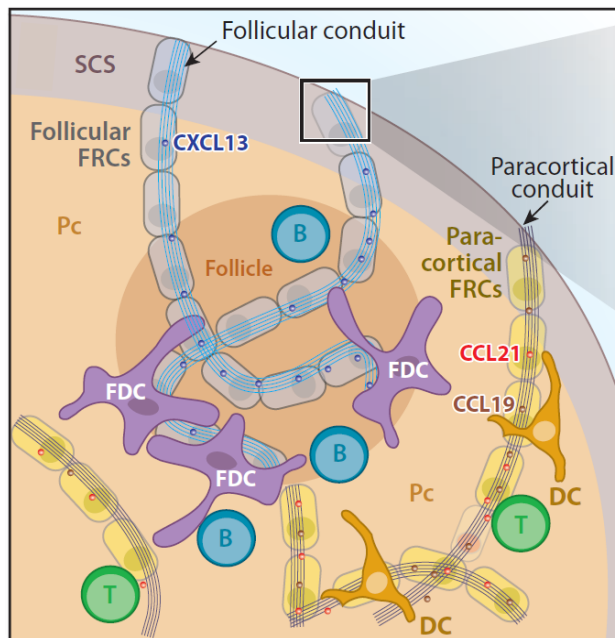
### 1.2.2.2. Trafic intra-ganglionnaire

Les lymphocytes circulants entrent donc dans les ganglions au travers des HEV. Ils sont alors dirigés vers les follicules ou le paracortex (Pc) suivant un gradient de chimiokines transportées par les FRC qui se divisent en conduits folliculaires et paracorticaux (Figure 12). Ainsi, les conduits paracorticaux transportent du CCL19 et du CCL21 qui attirent les cellules T et les DC dans la zone paracorticale et les cellules B longent les conduits folliculaires qui transportent du CXCL13 et sont attirées également par le CXCL13 exprimé par les FDC présentes dans les follicules [27].

Après avoir migré à l'intérieur du ganglion pendant plusieurs heures à la rencontre d'un antigène, les cellules B qui n'ont pas trouvé une cible suffisamment affine passent dans les sinus corticaux, rejoignent le sinus médullaire ou éventuellement le SCS et quittent le ganglion par le

vaisseau lymphatique efférent. Le passage des lymphocytes du cortex au réseau de sinus lymphatiques se fait grâce à un gradient de Sphingosine-1-Phosphate (S1P) et à son récepteur couplé aux protéines G, le récepteur 1 de la S1P (S1PR1). En effet, le sang et la lymphe sont concentrés en S1P alors que la concentration ganglionnaire est faible. De plus, les lymphocytes régulent l'expression membranaire de S1PR1, soit négativement au cours de leur entrée, soit positivement pour la sortie vers le sinus lymphatique [20].

Les cellules qui ont rencontré leur antigène spécifique prolifèrent et forment des CG. Seuls les clones avec l'affinité la plus élevée sont sélectionnés pour survivre dans les CG [22]. Plus l'affinité du BCR pour l'antigène est forte, plus le BCR est capable de s'oligomériser rapidement, c'est-à-dire de former des "microclusters" regroupant plusieurs récepteurs. Plus les microclusters sont importants, plus l'amplification du signal intracellulaire est important et la réponse efficace [34]. La signalisation résultant de l'activation du BCR induite par un antigène protéique spécifique est plus soutenue que lorsqu'elle est induite par un ligand [35].



**Figure 12. Trafic cortical des lymphocytes B (Gonzalez et al., 2011) [27].** Une fois dans les ganglions, les lymphocytes B rejoignent le sinus sous-capsulaire (SCS) puis migrent le long des conduits folliculaires (FRC) qui transportent du CXCL13 et jusqu'aux follicules dont les cellules dendritiques folliculaires (FDC) expriment également du CXCL13.

### 1.2.2.3. Trafic membranaire: Le BCR et sa signalisation

Dans les cellules B naïves, le BCR peut être sous forme de monomère et exclu des radeaux lipidiques ou pré-assemblé sous forme de complexes oligomériques au niveau des radeaux lipidiques et générer un niveau de signalisation basal. Après liaison d'un antigène, les complexes de BCR sont réorganisés et redirigés au sein de la membrane plasmique [36, 37].

## *Spreading*

L'évènement le plus précoce de l'activation des cellules B naïves est le regroupement de BCR en microclusters dans des domaines particuliers de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques. Ils permettent l'accumulation de protéines de signalisation et facilitent ainsi leurs interactions [17, 38]. En effet, la signalisation du BCR consiste en une cascade de phosphorylations et l'accumulation d'antigènes coïncide avec l'accumulation de tyrosines phosphorylées. C'est au niveau des microclusters que le BCR, phosphorylé par Lyn, est capable de recruter la kinase Syk, un effecteur clé de sa signalisation, alors que les régulateurs négatifs restent exclus des radeaux lipidiques. Syk est alors capable de recruter d'autres effecteurs tels que les protéines BLNK, Btk, PLC $\gamma$ 2 ou encore Vav, formant ainsi un microsignalosome. La formation des microclusters est indépendante de la signalisation du BCR mais le cytosquelette, impliquant l'actine et les protéines ERM (Ezrin-Radixin-Moesin), joue un rôle crucial dans le maintien de son intégrité et son organisation. Des co-récepteurs du BCR, tels que le CD19 ou les intégrines, régulent la réorganisation du cytosquelette et participent à l'activation des cellules. Le CD19 est une protéine transmembranaire contenant 9 résidus tyrosines capables de recruter des effecteurs de la signalisation du BCR tels que Vav ou PI3K, il joue ainsi un rôle d'adaptateur important dans l'amplification du signal à travers le BCR [39]. En effet, la cellule B nécessite d'accumuler de nombreux microsignalosomes afin d'atteindre un seuil d'activation suffisant. Pour se faire, elle induit un signal de propagation des microsignalosomes, appelé "spreading", proportionnel à l'affinité et à la densité de l'antigène. Ce phénomène de spreading est lui aussi dépendant du cytosquelette mais également de la signalisation [26].

## *Internalisation*

Le spreading et les microsignalosomes sont au maximum après 3 minutes de stimulation. Ensuite, la cellule enclenche une phase de contraction plus longue impliquant un nouveau réarrangement du cytosquelette. Il en résulte la formation de la synapse immunologique qui consiste en un regroupement (ou cluster) central des BCR, encerclé par un anneau de molécules d'adhérence telles que LFA-1 et VLA-4. La synapse agit comme une plateforme pour l'internalisation de l'antigène qui est nécessaire au recrutement de cellules T helper ainsi qu'à l'activation maximum des cellules B [26]. Après 15 minutes de stimulation, les microsignalosomes se dissocient [5].

## **1.2.2. Signalosome autour du BCR**

Durant l'activation des cellules B, un microsignalosome constitué de différentes protéines se crée autour du BCR. L'initiation et l'amplification du signal transmis par le BCR sont régulées par un fin équilibre entre des kinases et des phosphatases [35, 40-42]. L'un des premiers effecteurs mis en jeu dans la transduction du signal du BCR est la protéine cytoplasmique Syk.

### **1.2.2.1. Syk**

Syk a été découverte comme un fragment protéique doté d'une activité enzymatique tyrosine kinase dans des extraits cellulaires de rate porcine [43]. Exprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques, dont les cellules B, elle est également retrouvée dans des cellules non-hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes, les neurones, les hépatocytes et les cellules endothéliales vasculaires [44]. Selon le type cellulaire dans laquelle elle se trouve, Syk agit dans différentes voies de signalisation initiées par le BCR, le récepteur des cellules T (TCR), les récepteurs plaquettaires, les récepteurs aux cytokines telles que l'IL-2 (Interleukine-2) ou aux facteurs de croissance tels que le G-CSF (Granulocyte - Colony Stimulating Factor) ou encore les récepteurs Fc (Fragment, cristallisable). Syk est l'un des deux membres de la famille du même nom avec la protéine Zap70 (Zeta-chain-associated protein of 70 kDa). Ces deux kinases ont été principalement décrites pour jouer un rôle primordial dans la signalisation des récepteurs immuns ainsi que dans le développement des lymphocytes [45].

#### ***1.2.2.1.1. Rôles au cours du développement B***

En 1995, deux équipes ont généré des souris déficientes pour la protéine Syk (Syk<sup>-/-</sup>). Cette dernière est codée chez l'homme par le gène *SYK* qui est constitué de 13 exons et situé sur le chromosome 9. La première équipe a créé des mutants en supprimant un exon codant pour 41 résidus du sous-domaine VI du domaine kinase de Syk (correspondant aux acides aminés 477-517 chez l'humain) [46]. La seconde, quant à elle, a inséré le gène de résistance à la néomycine dans un exon contenant le sous-domaine I du domaine kinase de Syk [47]. Leurs travaux ont permis d'observer de sévères hémorragies pendant la phase embryonnaire, révélant un rôle de Syk dans le maintien de l'intégrité vasculaire. En dehors d'une mortalité périnatale chez les souriceaux déficients en Syk, les deux équipes ont également démontré un arrêt du développement cellulaire B à la transition entre les stades pro-B et pré-B, coïncidant avec une perte d'expansion clonale des

cellules exprimant une chaîne  $\mu$  fonctionnelle du BCR. Plus tard, une étude dévoilera que la mutation par insertion du gène de résistance à la néomycine dans le gène de Syk bloque la maturation des cellules B immatures en cellules circulantes et ainsi leur entrée dans les follicules ou zone B. L'ensemble de ces résultats démontre le rôle capital de Syk dans la signalisation du pré-BCR et ainsi dans la maturation des cellules B, sur la survie cellulaire et la migration des cellules B IgM<sup>+</sup> immatures vers les organes lymphoïdes périphériques [48].

### **Zap70**

Zap70, l'autre protéine de la famille Syk, est décrite pour s'associer à la chaîne zeta du TCR [49]. Si un défaut de Syk mène à l'absence de cellules B matures, un défaut de Zap70 aboutit quant à lui à une altération du développement des cellules T [50]. Malgré une expression exclusive dans les cellules T et les NK, Zap70 est également exprimée au cours du développement des cellules B murines où elle participe à la transition des stades pro-B / pré-B. En effet, les souris déficientes en Syk sont partiellement bloquées à cette étape transitionnelle alors que celles déficientes en Syk et en Zap70 le sont complètement [51]. Parallèlement, Syk a été montrée avoir un rôle important dans la signalisation du pré-TCR [50]. Les cellules T précoces qui arrivent dans le thymus n'expriment ni TCR, ni CD4, ni CD8 et sont alors nommés thymocytes double-négatifs (DN). Les DN peuvent être divisés en 4 étapes (DN1, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; DN2, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; DN3, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>; et DN4, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>). Au fur et à mesure que les thymocytes progressent dans les étapes DN2 vers DN4, ils expriment un pré-TCR composé d'une chaîne  $\alpha$  non-réarrangée et d'une chaîne  $\beta$  réarrangée au cours de l'étape DN3 [52]. Il s'avère que Syk est majoritairement exprimée lors des premières étapes DN1 à DN3. Après réarrangement et expression de la chaîne  $\beta$  du TCR, Syk est nécessaire à une signalisation initiale optimale du pré-TCR et à une entrée des thymocytes dans le cycle cellulaire au stade DN3. En effet, les thymocytes Syk<sup>-/-</sup> échouent dans la transition DN3 - DN4. Une fois amorcée par Syk, la signalisation du pré-TCR induit l'expression de Zap70 qui remplace alors Syk au stade DN3 et dans la suite du développement des thymocytes vers les étapes DN4 puis double positif (DP CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) [53].

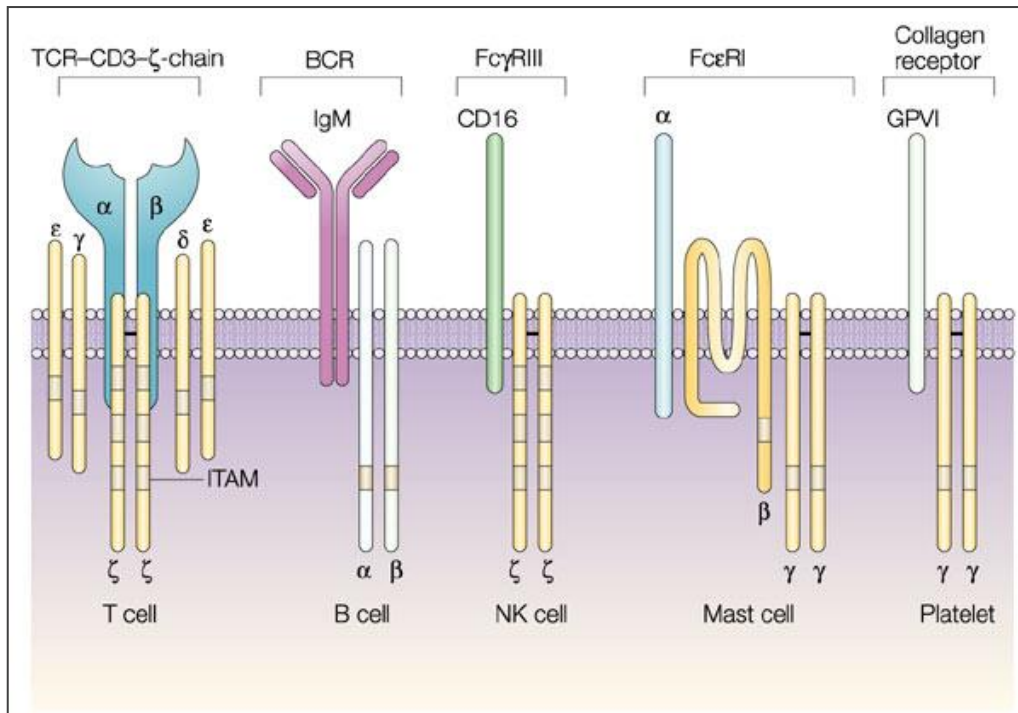
#### ***1.2.2.1.2. Autres voies impliquant Syk***

En dehors de son rôle dans les voies de signalisation des récepteurs immuns classiques de la réponse immunitaire adaptative, Syk fonctionne avec d'autres types de récepteurs impliqués dans l'adhérence cellulaire, la maturation des ostéoclastes, l'activation plaquettaire ou encore le

développement vasculaire. En effet, l'hémorragie de type pétéchiiale observée dans les embryons murins déficients en Syk est due à un défaut de séparation entre les vaisseaux lymphatiques et sanguins au cours du développement, ce qui suggère un rôle de Syk en dehors de la réponse immunitaire adaptative [50]. De plus, la découverte de motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) chez la drosophile indique également un autre rôle de Syk puisque les insectes sont dépourvus de système immunitaire adaptatif. Si la drosophile n'exprime pas Syk telle que nous la connaissons chez l'homme et la souris (voir paragraphe I.2.2.1.3), elle possède une protéine paralogue nommée SHARK (SH2 domain Ankyrin Repeat Kinase) qui est constituée d'une répétition de 5 motifs ankyrine entre ses 2 domaines SH2, d'une région riche en résidus proline, d'une région basique et d'un domaine tyrosine kinase. Exprimée dans les cellules épithéliales embryonnaires de l'épiderme, SHARK est essentielle à leur migration lors du développement de la drosophile [50].

### *i. Immuno-récepteurs classiques*

En plus de son rôle dans la signalisation du BCR depuis la surface des cellules B, Syk intervient également dans la signalisation d'autres cellules hématopoïétiques. En effet, Syk est capable de se fixer aux récepteurs incluant des motifs ITAM préalablement phosphorylés par des kinases SFKs (Src Family Kinases). Il peut ainsi se fixer au TCR *via* les chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  et CD3 $\xi$  associées et amorcer sa signalisation en aval. Syk peut également se fixer aux récepteurs Fc classiques généralement par l'intermédiaire de sous-unités associées tels que le récepteur Fc de haute affinité pour les IgE, le Fc $\epsilon$ RI, *via* ses chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  associées afin d'amorcer la dégranulation des mastocytes après liaison d'une IgE. Il peut lier le récepteur Fc de faible affinité pour les IgG, le Fc $\gamma$ RIII, exprimé dans les NK *via* les chaînes  $\xi$  ou  $\gamma$  (mêmes sous-unités  $\gamma$  du récepteur Fc pour les IgE) associées ou encore la glycoprotéine VI (GPVI), un récepteur au collagène, *via* les chaînes Fc  $\gamma$  afin de transduire le signal en réponse à la fixation d'un ligand (*Figure 13*) [50, 54]. Seul le récepteur d'affinité variable pour les différents isotypes d'IgG, le Fc $\gamma$ RIIA, exprimé à la surface des neutrophiles ou des macrophages ne possède qu'une chaîne  $\alpha$  contenant un motif ITAM dans sa partie intracellulaire et permet à Syk de s'y fixer directement afin d'activer les voies de signalisation aboutissant à la phagocytose ou à l'opsonisation [55].



**Figure 13. Composition des immunorécepteurs hématopoïétiques (Horejsi et al., 2004) [54].** Le récepteur des cellules T (TCR) s'associe en complexe avec le CD3- $\zeta$ ; le récepteur des cellules B (BCR) interagit avec les sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ ; le récepteur Fc de faible affinité pour les IgE (Fc $\gamma$ RIII ou CD16) qui est exprimé par les cellules NK s'associe à un dimère de chaînes  $\zeta$  (ou  $\gamma$ ); le récepteur Fc de forte affinité pour les IgE (Fc $\epsilon$ RI) interagit avec les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  pour transmettre le signal de dégranulation dans les mastocytes; et le récepteur au collagène qui est exprimé par les plaquettes est constitué quant à lui de la glycoprotéine VI (GPVI) qui permet la liaison du ligand et de la chaîne  $\gamma$  qui transmet le signal (la même utilisée par Fc $\gamma$ RIII et Fc $\epsilon$ RI).

## ii. Récepteurs aux lectines de type C

Les récepteurs aux lectines de type C (CLRs) forment une famille de protéines extracellulaires qui lient, d'une manière calcium dépendante, les carbohydrates et qui jouent un rôle dans la reconnaissance des particules fongiques. Ces récepteurs possèdent, dans leur queue cytoplasmique, un motif n'incluant qu'un seul résidu tyrosine phosphorylé, dit hemITAM, qui a été montré être reconnu par Syk [50]. L'interaction entre Syk et Clec-2 (C-type lectin-like receptor) ou Dectin-1 nécessite les deux domaines SH2 de Syk, suggérant la dimérisation de deux CLRs [56]. Cette hypothèse a été confirmée par des travaux montrant la dimérisation de Clec-2 dans les plaquettes et l'interaction de Syk dans une stœchiométrie de 2:1 [57]. La signalisation induite par le complexe CLR/Syk aboutit à l'activation des voies NFAT, MAP kinases ou encore PI3K qui seront décrites ultérieurement [50], permettant ainsi de moduler la réponse innée du système immunitaire.



### *iii. Intégrines*

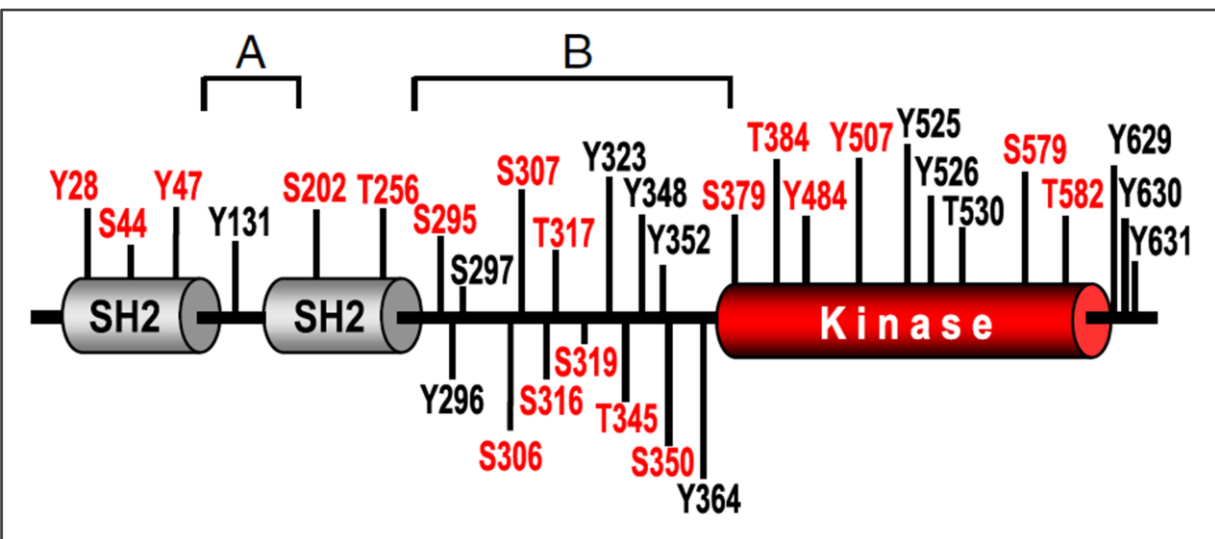
Syk peut également s'associer de manière indirecte à des récepteurs ne possédant pas de motif ITAM, comme les intégrines. Ces dernières forment une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques et participent à de nombreux processus d'adhérence et de migration cellulaires. Des premières études, effectuées dans un modèle cellulaire présentant l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  plaquettaire, ont montré que le mécanisme d'activation de Syk était indépendant d'un motif ITAM. Ce mécanisme met en jeu une liaison directe entre la queue cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines et la partie du domaine SH2-N-terminal de Syk ne liant pas le motif ITAM phosphorylé. Cependant, d'autres études plus récentes ont démontré que la liaison de résidus tyrosine phosphorylés aux domaines SH2 de Syk joue un rôle important dans certaines fonctions des intégrines, notamment dans les neutrophiles, macrophages et plaquettes. La connexion entre Syk et les intégrines s'effectue grâce à une protéine adaptatrice intermédiaire, telle que la protéine DAP12 (Death-associated protein 12) dans les neutrophiles et les macrophages [50]. Une approche structure-fonction *in vivo* a permis de mettre en évidence la nécessité des motifs ITAM dans la signalisation des intégrines dans les cellules hématopoïétiques et de démontrer le rôle crucial de Syk dans la régulation de la séparation entre les vaisseaux sanguins et lymphatiques [58]. L'ensemble de ces données révèle que la liaison de Syk aux intégrines dans les différents processus d'adhérence cellulaire peut être dépendant ou non des motifs ITAM. Ces deux processus ne s'excluant pas forcément, ils pourraient conjointement réguler l'activité de Syk [50].

#### *1.2.2.1.3. Structure et activation*

##### *i. Structures linéaires*

Identifiée comme une protéine de 40 kDa avec une activité kinase intrinsèque, Syk s'est révélée être une protéine de 72 kDa dont la séquence primaire montre les signatures de plusieurs domaines protéiques. Elle contient deux domaines d'homologie à Src (SH2) du côté N-terminal (de 85 et 84 acides aminés) ainsi qu'un domaine catalytique à activité tyrosine kinase conservé du côté C-terminal (255 acides aminés) [43]. Les 2 domaines SH2 sont séparés par un interdomaine A de 67 acides aminés et le domaine SH2 C-terminal est lié au domaine catalytique par un interdomaine B de 120 acides aminés [59]. Grâce à une arginine conservée chargée positivement, les domaines SH2 reconnaissent et lient de manière électrostatique des résidus tyrosine phosphorylés, et donc chargés négativement, sur les protéines voisines, permettant ainsi l'interaction entre deux

protéines [60]. Les protéines à activité tyrosine kinase sont connues pour catalyser des réactions d'autophosphorylation intra- ou inter-chaines aboutissant ainsi à l'activation complète de la protéine. Dans un premier temps, une dizaine de sites d'autophosphorylation ont été identifiés dans des cellules pré-B murines [61]. Grâce aux développements technologiques, 32 sites de phosphorylation ont été identifiés dans la séquence de Syk humaine, exprimée dans des cellules B Syk<sup>-/-</sup> (DT40), parmi lesquels 15 résidus tyrosine, 11 sérine et 6 thréonine (*Figure 14*) [62]. Le domaine kinase comprend une boucle d'activation de 15 acides aminés (520 - 534) contenant 2 tyrosines en position 525 et 526 [63]. Une fois phosphorylées, ces tyrosines conservées libèrent généralement le site de liaison à l'ATP permettant à la kinase d'exercer son activité catalytique [64]. Cependant, le rôle de ces tyrosines est moins clair dans le cas de Syk [65]. Enfin, la chaîne protéique de Syk se termine par une courte queue C-terminale contenant elle aussi 3 résidus tyrosine adjacents (629, 630 et 631) [59]. Il est important de noter que quasiment la moitié des résidus phosphorylés ont été localisés dans l'interdomaine B qui est impliqué dans le contrôle des fonctions de Syk [66].



**Figure 14. Structure primaire de Syk (Bohnenberger et al., Eur J Immunol, 2011) [62].** Syk est constituée de deux domaines d'homologie à Src (SH2) séparés par un interdomaine A et d'un domaine kinase séparé du tandem SH2 par un interdomaine B. Syk contient également 32 sites de phosphorylation identifiés.

## ii. Isoformes de Syk

La protéine Syk est codée par un gène localisé sur le bras long du chromosome 9 (9q22) [67]. Ce gène est transcrit en ARNm qui, une fois traduit, donne naissance à une isoforme complète de

635 acides aminés appelée SykA. Une autre isoforme de la protéine Syk, nommée SykB, est obtenue par épissage alternatif. Cette forme plus courte de Syk, délétée de 23 acides aminés (283 - 305) au début de l'interdomaine B dits "insert", possède une plus grande homologie avec la protéine Zap70 [50]. L'insert permet à SykA d'augmenter sa capacité de liaison aux motifs ITAM du BCR et de faire de SykA l'acteur principal de la signalisation du BCR [66, 68].

En ce qui concerne SykB, elle est naturellement exprimée à faible niveau dans le thymus, la rate et une variété de lignées cellulaires hématopoïétiques. Cette isoforme courte, moins affine pour le BCR, est également inefficace dans la restauration de la signalisation du récepteur FcεRI dans des mastocytes déficients en Syk et ainsi dans la restauration de la dégranulation [68]. Elle est décrite pour intervenir dans des voies de signalisation découlant d'autres récepteurs tels que les intégrines, les récepteurs aux cytokines ou encore les récepteurs couplés aux protéines G [66]. L'activité catalytique de SykB est similaire à celle de Syk suite à l'engagement des récepteurs immuns. Par exemple, SykB est aussi efficace que SykA dans la phosphorylation des protéines Cbl ou PLCγ1 dans un modèle de cellules rénales simiennes (Cos-1). L'insert ne semble donc pas affecter l'activité tyrosine kinase de Syk [69], permettant à SykB d'être aussi efficace que Syk pour déclencher les voies de signalisation qui aboutiront à la phagocytose [70]. De plus, SykB est moins sensible que SykA à l'action de protéases présentes dans des lysats mastocytaires (RBL-2H3), ce qui permet à SykB de résister à la protéolyse induite dans certaines circonstances physiologiques et ainsi de lui conférer un avantage [69].

### *iii. Conformations tridimensionnelles*

Appartenant à la même famille, un fort pourcentage d'homologie a été observé entre les séquences primaires de Syk et de Zap70 chez l'homme (74% entre les domaines kinases et plus de 50% entre les domaines SH2) [49]. Ce pourcentage d'homologies élevé a conduit à des conformations tridimensionnelles de Syk et Zap70 proches mais non identiques. La première structure cristallographique résolue a été celle de la protéine Zap70 dont la séquence était mutée sur ses résidus tyrosine 315 et 319 et dont 53 résidus de l'interdomaine B (257 - 309) et 14 de la boucle d'activation (488 - 501) étaient absents. Elle révèle que Zap70 adopterait une conformation auto-inhibée, maintenue par des interactions aromatiques et hydrophobes, lorsqu'elle est non activée [71, 72].

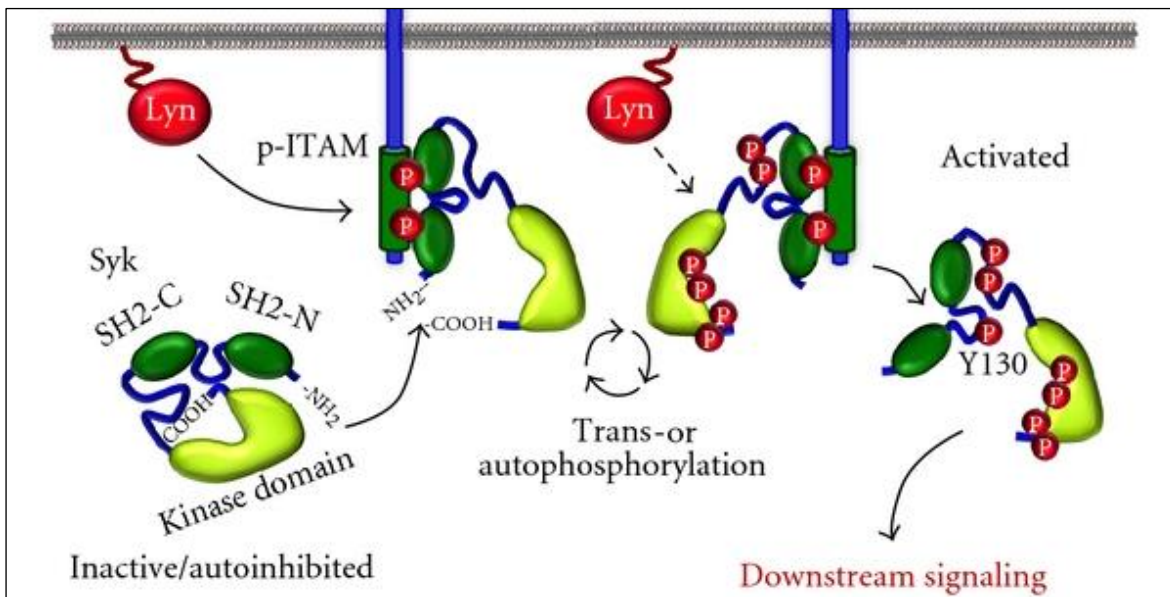
Concernant Syk et jusqu'à récemment, seule la structure des deux domaines SH2 montrait que ces derniers s'associaient de façon antiparallèle aux deux tyrosines phosphorylées du motif ITAM du BCR. De plus, contrairement aux domaines SH2 de Zap70 qui forment une seule unité, ces deux domaines de Syk peuvent agir indépendamment l'un de l'autre. Cette flexibilité structurale expliquerait l'implication fonctionnelle de Syk dans de nombreuses voies de signalisation [73]. La structure tridimensionnelle de la protéine totale Syk a ensuite été modélisée par microscopie électronique à particule simple. Avec une résolution moyenne, cette étude révèle que l'organisation structurale globale de Syk est similaire à celle de Zap70. Une compaction de la protéine, due à des interactions entre les unités catalytique et régulatrice, aboutit à un état d'auto-inhibition, ressemblant à celui décrit pour Zap [74]. Deux ans plus tard, cette même équipe utilisant la même approche, démontre que la structure de Syk est modifiée suite à une réaction *in vitro* d'autophosphorylation [75]. Ce n'est qu'en 2013 que la structure cristallographique, plus résolutive, de la protéine entière humaine Syk a été résolue à l'exception des 8 premiers acides aminés et d'une partie de l'interdomaine B (265-336), correspondant à la séquence spécifique de l'insert. Ces travaux proposent un modèle dans lequel les protéines Syk sauvage et mutée sur les résidus tyrosine 348 et 352, très vraisemblablement non-phosphorylées et inactives, ont des structures identiques et donc une conformation auto-inhibée [63].

#### ***iv. Activation de Syk***

Dans le modèle actuel, la phosphorylation du motif ITAM du BCR par les SFKs permet l'accrochage du domaine SH2 C-terminal de Syk à la tyrosine N-terminale phosphorylée du motif ITAM [76]. S'en suit un changement de conformation permettant au domaine SH2 N-terminal de Syk de lier la tyrosine C-terminale phosphorylée du motif ITAM [77]; les deux chaînes s'associent ainsi en antiparallèle [73, 77]. Les sites d'autophosphorylation deviennent alors accessibles et phosphorylés *in vitro*, preuve d'une augmentation de l'activité kinase de Syk (*Figure 15*).

Une comparaison des structures cristallines de Syk et Zap70 a permis d'avoir des détails sur leur mécanisme d'activation qui se sont révélés être légèrement différents. A l'inverse de l'alignement de leur séquence primaire, l'alignement de leur structure montre que le couple de tyrosines 348/352 de Syk n'est pas superposable au couple de phénylalanines 315/319 de Zap70. En effet, la tyrosine 348 de Syk s'aligne avec la phénylalanine 319 de Zap70 alors que la tyrosine 352 de Syk se superpose à l'acide glutamique 323 de Zap70. Dans le modèle structural de Syk, la

phosphorylation du résidu tyrosine 348 déstabiliserait le contact entre les interdomaines A et B et permettrait la phosphorylation du résidu tyrosine 352 plus exposé [63].



**Figure 15. Activation de Syk via les motifs ITAMs (de Castro et al., J Trans, 2011) [68].** Suite à la liaison d'un ligand à un immuno-récepteur, Lyn phosphoryle les motifs ITAMs qui servent d'ancrage à la kinase Syk. Cette dernière subit un changement de conformation qui libère Syk de sa structure auto-inhibée et augmente son activité kinase. Syk est alors phosphorylée, par trans- ou autophosphorylation, sur différents résidus tyrosines dont le 130 qui libère Syk du récepteur, lui permettant de phosphoryler ses cibles.

C'est aussi en 2013 avec la résolution de la structure de la protéine Zap70, où seuls les 14 résidus C-terminaux manquent et les deux résidus tyrosine 315 et 319 sont conservés, que le modèle d'activation de Zap70 s'est précisé. En effet, dans la modélisation de Zap70 mutée, les deux phénylalanines 315 et 319 étaient proches et prises en "sandwich" entre des résidus hydrophobes et aromatiques de l'interdomaine A [78]. En revanche, dans la modélisation de Zap70 sauvage, seule la tyrosine 315 est prise en "sandwich" entre des résidus hydrophobes et aromatiques. Les interactions hydrophobes et les ponts hydrogènes formés permettent de stabiliser l'interdomaine B. Dans cette conformation, la tyrosine 315 reprend la place de la phénylalanine 319 dans la structure de Zap70 et se superpose à la tyrosine 348 de Syk. La tyrosine 319 de Zap70, quant à elle, se retrouve superposée à la tyrosine 352 de Syk et est coincée dans le lobe N-terminal du domaine kinase. Ce petit lobe contient une séquence riche en résidus glycine, importante pour les fonctions catalytiques des protéines kinases, ainsi qu'une lysine essentielle pour la liaison de l'ATP dans le site actif. La présence de la tyrosine 319 permet alors de stabiliser la conformation inactive du

domaine kinase [79]. Dans le cas de Zap70, la phosphorylation du motif ITAM permet aux domaines SH2 de Zap70 de s'y fixer. Il s'effectue alors un changement de conformation qui aboutit à l'ouverture de la protéine. Cependant, pour que celle-ci soit complètement activée, les tyrosines 315 et 319, ainsi que la tyrosine 493 présente dans la boucle d'activation, doivent être phosphorylées par Src [78]. Syk et Zap70 sont deux enzymes allostériques qui opèrent un changement conformationnel après s'être fixées à un motif ITAM phosphorylé afin de pouvoir être phosphorylées à leur tour et ainsi complètement activées.

Les différences conformationnelles observées entre Syk et Zap70 pourraient expliquer les différences importantes dans leur activité. En effet, la conformation auto-inhibée légèrement plus ouverte de Syk par rapport à celle de Zap70 expliquerait sa plus grande capacité d'activation puisque l'activité kinase de Syk est environ cent fois plus importante que celle de Zap70 [74, 80].

#### ***v. Dépendance des SFKs***

Parmi les différences observées entre Syk et Zap70, l'une concerne leur dépendance différentielle aux SFKs. En effet, si l'intervention des SFKs est indispensable à la phosphorylation et à l'activation de Zap70 [49, 74], Syk est capable de s'activer uniquement par autophosphorylation *in vitro* [61, 81]. Cependant, la transfection de cellules B de poulet (DT40) déficientes en Syk ou en Lyn avec une construction codant pour la séquence murine de Syk dont le domaine catalytique a été inactivée en remplaçant la lysine essentielle du site actif par une arginine (K396R), montre que Lyn augmente la phosphorylation de Syk sur les tyrosines de son interdomaine B (Y317, Y342 et Y346 chez la souris et Y323, Y348 et Y352 chez l'homme) [82]. Une autre étude confirme que l'inhibition de Syk par un agent chimique diminue la phosphorylation des tyrosines 519 et 520 (525/526 humaines), sites majeurs d'autophosphorylation, alors qu'elle n'affecte pas la phosphorylation de la tyrosine 346 (352 humaine) majoritairement phosphorylée par les SFKs [35].

Ainsi, l'inhibition des SFKs interfère fortement avec l'influx calcique induit par Zap70 en réponse à une stimulation du TCR alors qu'elle ne fait que diminuer ou retarder l'influx calcique induit par Syk en réponse à une stimulation du BCR respectivement par un ligand ou un anticorps. De plus, la signalisation du BCR induite par la liaison d'un ligand est plus sensible aux SFKs que celle initiée par la liaison d'un anticorps. En effet, une stimulation par un anticorps anti-BCR permet une meilleure activation des SFKs qui est partiellement inhibée en présence de drogues ciblant les SFKs [35]. Par ailleurs, une autre étude montre que la dépendance de Syk vis à vis des SFKs se fait

en fonction de la densité de l'antigène qui lie le BCR. Si l'activité de Syk requiert l'action des SFKs dans le cas d'un antigène monovalent, cette nécessité disparaît lorsque plusieurs BCRs se regroupent à la surface des cellules. Malgré l'efficacité reconnue des SFKs dans la phosphorylation des motifs ITAMs (au moins celle de la tyrosine 182) et l'initiation de la signalisation du BCR, Syk s'est révélée être également capable de phosphoryler les motifs ITAMs, indépendamment des SFKs. En effet, l'agrégation des BCRs permet à Syk de phosphoryler les motifs ITAMs adjacents ainsi que les Syk voisines aboutissant à une boucle d'activation positive qui permet d'atteindre un seuil déclenchant les voies de signalisation en aval. Zap70, quant à elle, est incapable de phosphoryler les motifs ITAMs et requiert donc l'activité enzymatique des SFKs pour initier les voies de signalisation en aval du récepteur. En conclusion, l'agrégation de plusieurs molécules de BCRs, dite en "cluster", rend les cellules B relativement indépendantes à l'activité kinase des SFKs mais hautement dépendantes à l'activité kinase de Syk. Les SFKs servent alors à accélérer l'initiation et à augmenter la sensibilité du BCR en réponse aux ligands les moins multivalents [41].

#### *1.2.2.1.4. Régulation*

Syk est présente dans de nombreux types cellulaires et intervient dans plusieurs processus cellulaires. Son mécanisme d'activation est complexe et se doit d'être finement régulé pour lui permettre d'intervenir de façon spécifique dans la réponse cellulaire.

##### *i. Régulation positive*

**Tyrosine 131.** La phosphorylation de Syk murine sur le résidu tyrosine 130 (Y131 chez l'humain), localisé dans l'interdomaine A, apporte une charge négative qui interfère et déstabilise la conformation auto-inhibitrice de l'interdomaine A. Les deux domaines SH2 changent alors d'orientation et s'éloignent l'un de l'autre, adoptant ainsi une structure moins affine pour le BCR. Cette phosphorylation provoque ainsi le décrochage de Syk du BCR et sa libération dans le cytoplasme. En effet, le remplacement de la tyrosine 130 par une phénylalanine (Y130F) non chargée augmente la capacité de liaison de Syk au BCR tandis qu'un résidu glutamate (Y130E) portant une charge négative permanente diminue cette capacité de liaison [68, 83]. En plus de son rôle dans la liaison du BCR, la phosphorylation de Syk sur la tyrosine 130 déstabilise l'interaction de l'interdomaine A avec l'interdomaine B et le domaine kinase, entraînant une augmentation de son activité catalytique. Ces résultats suggèrent que le résidu tyrosine 130 est impliqué dans la perturbation de la structure auto-inhibitrice de l'interdomaine A et élimine l'effet inhibiteur imposé

par la position des deux domaines SH2 par rapport au domaine kinase [59]. D'autre part, la phosphorylation de la tyrosine 130 ou son « imitation » grâce à un mutant Syk (Y130E) a été décrite pour jouer un rôle dans d'autres voies de signalisation que celle du BCR. En effet, elle permet la liaison de Syk aux fibronectines qui, elles-mêmes, lient les intégrines et permettent l'adhérence cellulaire des cellules B (DT40) [84] ou encore, elle permet à Syk de lier et de phosphoryler les composants des centrosomes aboutissant à la mitose des cellules de cancer du sein (MCF-7) [85].

**Tyrosines 348 et 352.** Les résidus tyrosine 342 et 346 de Syk chez la souris (Y348 et Y352 chez l'homme) sont situés dans l'interdomaine B, proches du domaine kinase et peuvent être phosphorylés indépendamment l'un de l'autre. De plus, leur taux de phosphorylation semble être dépendant de l'espèce. En effet, la phosphorylation de la tyrosine 346 (équivalent 352 humain) est prédominante *in vitro* chez la souris [59] alors que la phosphorylation de la tyrosine 348 (équivalent 342 murin) est quant à elle prépondérante chez l'homme [62]. Leur phosphorylation, induite par Syk elle-même ou par les SFKs, renforce la signalisation du BCR en augmentant l'activité enzymatique de Syk d'une part et en créant des sites de liaison qui favorisent l'interaction protéine-protéine d'autre part [59].

**Tyrosines 525 et 526.** Les résidus tyrosine 525 et 526, situés dans la boucle d'activation du domaine catalytique de Syk, sont principalement des sites d'autophosphorylation. En effet, leur phosphorylation est indétectable dans des cellules B de poulet (DT40) déficientes en Syk sauvage et exprimant le mutant Syk (K396R) [82]. Cependant, il a été montré dans les mastocytes que les SFKs sont capables de phosphoryler ces deux tyrosines en réponse à l'activation d'un récepteur Fc par un ligand de faible affinité. Les SFKs aideraient alors Syk à initier et à accélérer le processus de signalisation [86]. Dans la conformation inactive de Syk, les tyrosines 525 et 526 (et 530) de la boucle d'activation sont orientées vers le site de liaison de l'ATP. Même si la tyrosine 525 est la plus proche du site d'ATP et donc la plus facilement phosphorylable [63], c'est la phosphorylation de la tyrosine 526 qui est prédominante suite à une stimulation du BCR [62]. Ces résultats suggèrent donc un changement conformationnel significatif en accord avec le modèle d'activation de Syk [63]. Pour la plupart des kinases, la phosphorylation des tyrosines contenues dans la boucle d'activation reflète leur activation complète. En revanche, pour Syk, la mutation d'une ou des deux tyrosines du site actif n'a pas ou peu d'effet sur son activité enzymatique *in vitro*, suggérant que la boucle d'activation de Syk existe dans un état activable [63, 65]. Pourtant, cette mutation diminue fortement la phosphorylation des substrats de Syk *in vivo* et crée un déficit majeur dans la



signalisation des cellules B ou des mastocytes [65, 87, 88]. Il y a donc un manque de corrélation entre l'effet de la phosphorylation des tyrosines 525 et 526 *in vitro* et *in vivo*. Ceci pourrait s'expliquer par une fonction de Syk indépendante de son activité kinase. La phosphorylation des tyrosines 525 et 526 pourrait alors générer un site de liaison de Syk à une ou plusieurs protéines présentes uniquement dans les cultures cellulaires [59].

**Tyrosines 629 et 630.** La queue C-terminale de Syk présente trois résidus tyrosine successifs aux positions 629, 630 et 631 (Y623, Y624 et Y625 chez le rat). La mutation des 3 résidus (ou des résidus Y624 et 625) entraîne une augmentation de la phosphorylation basale sur les autres résidus tyrosines 317 (Y323 humain) et Y519/Y520 (Y525/Y526 humain). Il en résulte une diminution de la capacité de liaison de Syk au motif ITAM du BCR ainsi qu'une diminution de son activité kinase aboutissant à une inefficacité de la signalisation en aval du BCR. Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel, à l'état de repos, ces tyrosines, mais surtout les Y624 et Y625, interagissent avec l'interdomaine A et le domaine catalytique afin de maintenir Syk dans une conformation auto-inhibée. Lors de l'activation d'un immunorécepteur, la liaison de Syk au motif ITAM provoque un changement de conformation qui expose les tyrosines de la queue C-terminale et fait passer Syk d'un état auto-inhibé à activé. Les tyrosines 624 et 625 peuvent alors être autophosphorylées, déstabilisant la molécule pour la maintenir dans un état activé [89]. En effet, une autre étude montre que le domaine SH2 de la protéine adaptatrice BLNK se lie alors à la tyrosine 630 de Syk, le complexe BLNK/Syk remplaçant le complexe ppITAM/Syk dans le maintien de l'activation de Syk. De plus, l'interaction entre Syk et BLNK n'étant pas observée quand est exprimé un mutant "kinase dead" de Syk, suggère que la tyrosine 630 est un site d'autophosphorylation [71]. L'ensemble de ces données montre l'importance des résidus tyrosines de la queue C-terminale de Syk dans la régulation de ses fonctions [89].

**Sérine 291.** En dehors des résidus tyrosine, la séquence de Syk est également composée de plusieurs résidus sérine et thréonine phosphorylables [62], dont la sérine en position 291 qui est située dans l'insert de 23 acides aminés de l'interdomaine B. Cette sérine est un site de phosphorylation majeur de Syk et régule également des voies de signalisation en aval du BCR. En effet, la phosphorylation de la sérine 291 par la protéine kinase C en réponse à une stimulation du BCR par un anti-IgM ou des PKCs par un mélange PMA-ionomycine aboutit, par exemple, à l'augmentation de l'activation des facteurs de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) ou Elk-1 dans les cellules B (DT40) [90].

## *ii. Régulation négative*

La tyrosine 323, située au début de l'interdomaine B, a été décrite pour réguler négativement le signal transmis par le BCR. En effet, la transfection des cellules DT40 avec une construction codante pour la séquence de Syk murine mutée sur la tyrosine 317 (Y323 humaine) aboutit à une augmentation de la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2, de l'influx calcique et de l'activité de NFAT en réponse à une stimulation du BCR [82]. Par ailleurs, l'absence de Lyn dans le même modèle cellulaire montre une faible phosphorylation de la tyrosine 317 et une réponse calcique augmentée. Enfin, les cellules de souris déficientes en Syk et exprimant un mutant "kinase dead" de Syk voient leur forme de Syk phosphorylée sur le résidu tyrosine 317. L'ensemble de ces résultats montre que la tyrosine 317 est préférentiellement phosphorylée par Lyn et suggère un mécanisme par lequel Lyn fonctionnerait comme un régulateur négatif de Syk dans la signalisation du BCR [68, 91].

## *iii. Localisation cellulaire*

En dehors des phosphorylations impliquées dans la régulation de l'activité catalytique de Syk, les fonctions de cette kinase peuvent aussi dépendre de sa localisation cellulaire. Décrite comme une kinase cytoplasmique, Syk est également retrouvée dans le noyau dont elle disparaît après un engagement soutenu du BCR. Il est à noter que Syk ne contient pas de séquences NLS (signal de localisation nucléaire) ni NES (signal d'exportation nucléaire). Cependant, une séquence de 6 acides aminés (359 - 364), riche en résidus leucines et située dans l'interdomaine B, permet à Syk de faire la navette entre les deux compartiments. Les acides aminés précédents (332 - 358) constituent une séquence qui renforce ce système de navette [92]. Une autre étude a montré que la mutation de la tyrosine 290 en phénylalanine, située également dans l'interdomaine B, aboutit à la localisation exclusivement cytoplasmique de Syk dans les cellules B ; cette mutation entraînant l'apparition d'une séquence NES dans Syk. Ces résultats sont cohérents avec l'absence du résidu tyrosine 290 dans les protéines Syk B et Zap70 qui sont localisées dans le cytoplasme et le compartiment nucléaire [90]. Ce système de navette permettrait à Syk, activée à la membrane, de transiter vers le noyau où elle phosphorylerait des substrats nucléaires. Le processus d'exclusion nucléaire de Syk, quant à lui, est indirectement dépendant de l'activation des PKCs suite à une stimulation du BCR. De plus, le temps de réponse particulièrement long suggère la synthèse *de novo* de nouvelles protéines qui interagiraient avec Syk dans le noyau. Syk est une protéine requise à la fois pour la survie et pour l'apoptose des cellules B induites par le BCR. Dans ce contexte, l'un des rôles décrits pour Syk

dans le noyau est de rendre les cellules résistantes à l'activation des caspases-3, suite à un stress oxydatif, pendant que la forme cytoplasmique augmente leur activation [92].

### ***1.2.2.1.5. Fonctions***

#### ***Tyrosine kinase***

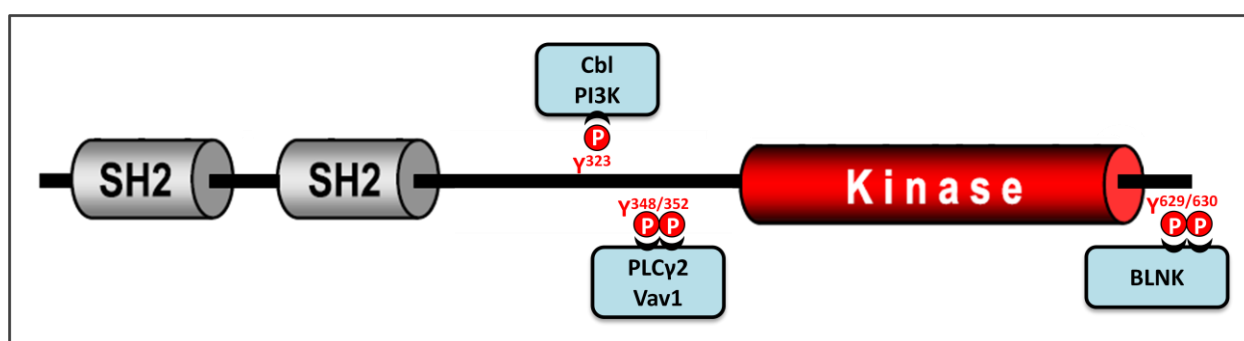
La fonction principale de Syk réside dans son activité enzymatique tyrosine kinase [43]. Une fois activée, elle s'autophosphoryle [61] et phosphoryle différents substrats [59]. Dans des cellules B déficientes en Syk et transfectées avec le mutant Syk inactif (K396R), ce dernier est recruté par le BCR mais est incapable de restaurer la signalisation en aval [93]. En effet, dans un contexte normal, les SFKs phosphorylent préférentiellement les motifs ITAM du BCR, permettent l'accrochage de Syk par l'intermédiaire de ses domaines SH2. Syk sauvage phosphoryle alors les tyrosines des motifs ITAM adjacents ainsi que les molécules Syk voisines *via* son activité enzymatique. Le recrutement de plus de molécules Syk activées permet ainsi une amplification du signal. Une fois activée, Syk interagit avec plusieurs molécules adaptatrices et phosphoryle de nombreuses molécules en aval du BCR. Cette boucle de régulation positive est nécessaire pour atteindre un seuil de déclenchement d'une signalisation efficace [35, 41, 42, 94].

#### ***Double spécificité enzymatique***

Malgré une activité tyrosine kinase de Syk bien établie, cette protéine s'est révélée être aussi dotée d'une activité sérine/thréonine kinase. En effet, suite à une activation du BCR, la sous-unité Ig $\alpha$  de ce récepteur est phosphorylée sur un résidu sérine 197 qui joue un rôle négatif dans la signalisation du BCR. Étonnamment, Syk s'est révélée être la kinase responsable de cette modification post-traductionnelle. Cette dernière possède donc une double activité kinase sur sérine/thréonine et tyrosine ayant des rôles opposés dans la transmission du signal par le BCR [95]. L'activité sérine kinase de Syk a également été démontrée *in vitro* et *in vivo* sur le facteur de transcription Ikaros (S358 et S361 murins ou S361 et S364 humains). Dans un modèle de cellules pré-B humaines, Syk phosphoryle Ikaros, indépendamment du BCR, après engagement du CD19. Ikaros phosphorylé sur ses résidus sérine est transféré dans le noyau où son activité de liaison à des séquences spécifiques de l'ADN augmente. La phosphorylation par Syk module donc la fonction du facteur de transcription Ikaros, un régulateur clé de la différenciation des cellules B [96].

## Adaptateur

La fonction de Syk ne passe pas seulement par son activité kinase. Décrite comme une plateforme d'ancrage, Syk joue également un rôle d'adaptateur en s'associant à de nombreux effecteurs protéiques impliqués dans divers voies de signalisation (Figure 16). Comme décrit précédemment, la mutation de l'une ou des deux tyrosines de la boucle d'activation de Syk n'affecte pas son activité enzymatique mais perturbe sa signalisation en aval. Ainsi, en s'associant à des régulateurs positifs ou négatifs, Syk module des réponses cellulaires qui conduiront à la prolifération ou la différenciation des cellules B par exemple [71].



**Figure 16. Interactome de Syk (d'après Bohnenberger et al, Eur J Immunol, 2011) [62].** Syk joue un rôle d'adaptateur en interagissant avec de nombreux régulateurs positifs (BLNK, PLCγ2, Vav1, PI3K) et négatifs (Cbl) via une reconnaissance de ses phosphoaccepteurs par les domaines SH2 de ses partenaires.

### I.2.2.2. Partenaires de Syk

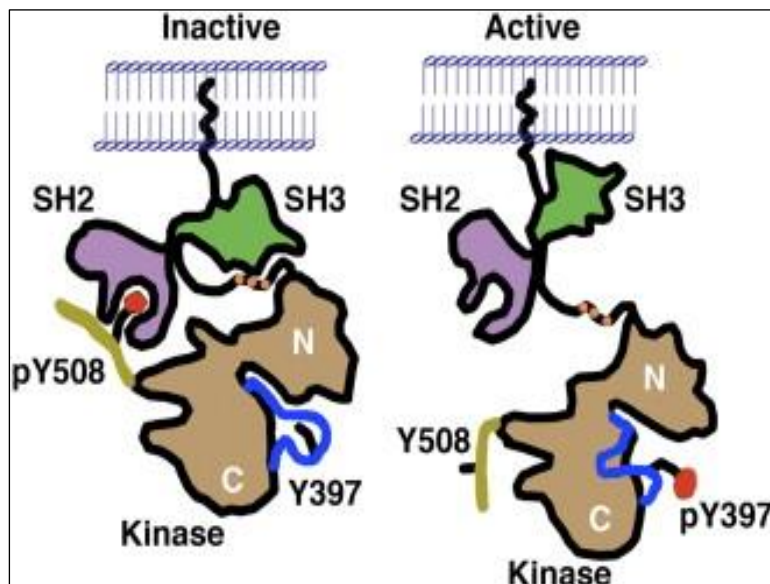
Suite à l'engagement du BCR, Syk se fixe aux motifs ppITAM phosphorylés du récepteur avant d'être totalement activée. Par l'intermédiaire de ses fonctions kinase et adaptatrice, Syk recrute différents effecteurs et forme des complexes (ou signalosome) qui déclenchent différents types de réponses en fonction des partenaires impliqués.

#### I.2.2.2.1. Régulateurs mixtes: les SFKs

La famille des protéines tyrosine kinases Src (SFK) comprend différents membres dont Lyn, Fyn, Blk, Yes, Fgr, Lck, Hck, Src et Yrk. Les sept premières sont exprimées dans les cellules B avec Lyn, comme représentante majoritaire [35], et Blk spécifique des cellules B [97].

**Développement.** Une série d'études effectuées chez la souris, dont les gènes codant pour les SFKs ont été mutés, a révélé le rôle crucial de ces kinases dans le développement des cellules B. La première étude réalisée sur des souris déficientes en Lyn (Lyn  $^{-/-}$ ) n'a pas montré de troubles majeurs du développement mais un défaut de cellules B matures ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules B-1 [98]. Ces résultats s'expliquent par la compensation fonctionnelle de Lyn par les autres SFKs exprimées dans les cellules B murines. Des souris triples déficientes en Lyn, Fyn et Blk (SFKs majoritairement exprimées dans les cellules B) présentent un blocage plus précoce de leur développement B, à la transition entre les stades pro-B et pré-B [97].

**Structure.** Les SFKs présentent une même structure primaire. Elles contiennent un domaine SH4 N-terminal qui permet leur ancrage aux membranes suite à l'addition de groupements lipidiques (acylation, palmitoylation, myristoylation), une région unique caractéristique de chaque SFK qui contrôlerait leur liaison à différentes protéines membranaires, un domaine SH3 (Src Homology 3) affin pour les motifs riches en prolines, un domaine SH2 permettant la reconnaissance de protéines *via* un résidu tyrosine phosphorylé, un domaine kinase et une région C-terminale. En dehors de cette succession de domaines, les SFKs présentent également des modifications par phosphorylation sur deux résidus tyrosines essentiels : l'un est situé dans la boucle d'activation du domaine kinase (communément appelé Y<sup>416</sup> en référence à Src, Y<sup>397</sup> dans Lyn) et l'autre dans la région C-terminale (Y<sup>527</sup>Src, Y<sup>508</sup>Lyn) [98-101].



**Figure 17. Structure générale des kinases SFKs en conformations inactive et active (Ingley et al., 2008) [99].** A gauche, la configuration inactive montre que le domaine SH2 interagit avec la tyrosine C-terminale phosphorylée (pY508) et le domaine SH3 interagit avec les prolines de l'interdomaine SH2 - kinase. A droite, la phosphorylation de la tyrosine C-terminale (pY397) rompt les interactions intramoléculaires et libère le site de liaison aux substrats et aux molécules de régulation.

Comme les protéines Syk et Zap70, les SFKs présentent plusieurs niveaux d'activation. Elles adoptent une conformation fermée, les maintenant dans un état auto-inhibé, qui est permis grâce à plusieurs interactions intramoléculaires. En effet, le motif SH3 se lie au motif riche en prolines de l'interdomaine situé entre les domaines SH2 et kinase. De plus, le domaine SH2 interagit avec le résidu tyrosine de la queue C-terminale qui est phosphorylé à l'état inactif (*Figure 17*). Les SFKs sont activées par la déphosphorylation de cette tyrosine C-terminale. Elles sont alors transphosphorylées par d'autres SFKs sur la tyrosine située dans la boucle d'activation [99].

**Fonctions.** La principale fonction des SFKs consiste en leur activité tyrosine kinase qui peut être régulée par leurs autres domaines. L'absence des résidus Glycine 2 ou Cystéine 3, qui empêche leur ancrage à la membrane, entraîne un blocage de la fonction kinase des SFKs dans de nombreuses voies de signalisation [101]. L'activité kinase de Lyn est également inhibée par déphosphorylation de sa tyrosine 397 contenue dans la boucle d'activation [102].

La majorité des voies de signalisation initiées par une stimulation antigénique passe par une activation de Syk qui est dépendante de Lyn. Reste une partie du signal associée à Lyn qui, indépendamment de Syk, induirait l'état d'anergie [98]. Plusieurs études s'accordent à écrire que les SFKs phosphorylent au moins la première tyrosine du motif ITAM (Y182 sur Ig $\alpha$ ) et qu'elles initient ainsi la réponse induite par un antigène [35, 71]. Les SFKs s'associent alors à des co-récepteurs positifs, comme le CD19, qui permettent l'amplification et le maintien du signal, soit en recrutant plus de SFKs, soit en les séquestrant sous une forme activée par des co-récepteurs négatifs tels que le CD22 [35, 98]. Les SFKs, et préférentiellement Lyn, phosphorylent alors Syk [103] puis Btk permettant la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 et une augmentation de la réponse calcique [98]. Les souris, exprimant une forme de Lyn constitutivement active, présentent une hyperactivation des protéines de la signalisation telles que Syk. Ce rôle positif est confirmé par des travaux effectués dans les cellules B DT40 déficientes en Lyn. Ces cellules présentent une activation retardée et diminuée de la réponse au BCR qui découlerait de l'activation d'autres SFKs qui compenseraient l'absence de Lyn [35].

Contrairement au rôle activateur de Lyn décrit précédemment, les cellules B de souris Lyn  $^{-/-}$  présentent une hyperprolifération associée à une hyperactivation des MAPKs et de Akt ainsi qu'une augmentation du flux calcique en réponse à une stimulation antigénique [102]. Cette hyper-réponse est expliquée par un rôle de Lyn dans la phosphorylation du motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) du CD22. Ce motif inhibiteur, une fois phosphorylé par Lyn,

permet le recrutement de la phosphatase Shp1 qui déphosphoryle à son tour le CD19 [98]. De plus, Lyn est impliquée dans l'interaction constitutive entre Shp1 et CD5 qui régule négativement le BCR et induit l'apoptose dans les cellules B1 [104, 105].

Le double rôle de Lyn dans la phosphorylation des co-récepteurs CD19 et CD22, respectivement des régulateurs positif et négatif de la signalisation du BCR, révèle sa complexité à moduler le signal transmis par le BCR [98], faisant des SFKs des modulateurs essentiels de la signalisation dans les cellules immunitaires.

#### *1.2.2.2. Régulateurs positifs*

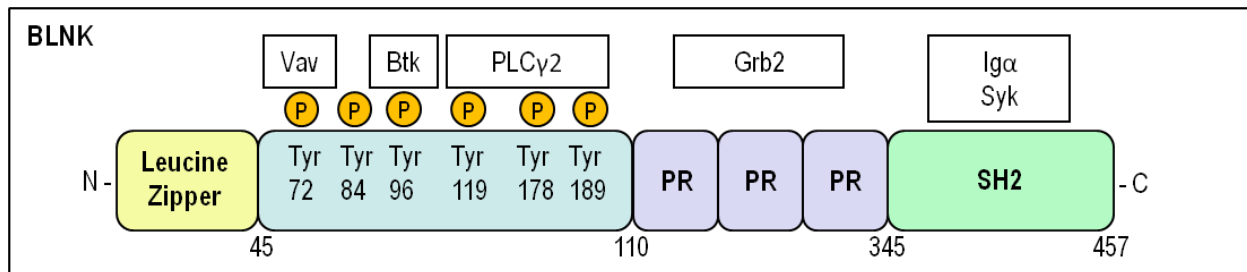
##### *BLNK*

La protéine BLNK (B cell LiNKer protein), aussi appelée SLP-65 (Adaptor protein SH2 domain-containing Leucocyte Protein of 65 kDa), a été identifiée comme une protéine adaptatrice entre le complexe BCR/Syk et les protéines PLC $\gamma$ 2, Vav ou encore Grb2 dans les cellules B humaines et murines. Elle est spécifique de la lignée cellulaire B et présente des homologies de séquence (environ 33 %) et de structure avec SLP-76 [106, 107], son homologue exprimée dans les cellules T, les cellules NK, les granulocytes, les macrophages et les plaquettes [108]. BLNK est codée par un gène localisé sur le chromosome 10q23 et composé de 17 exons [109]. Longue de 556 acides aminés, BLNK a un poids moléculaire d'environ 70 kDa. Elle existe également sous une autre isoforme, plus courte de 23 acides aminés (203 - 225), ayant un poids moléculaire d'environ 68 kDa. Cette dernière isoforme est obtenue par épissage alternatif de l'exon 8 [110] et exprimée dans les cellules B humaines alors que les cellules B murines n'expriment que l'isoforme longue [106].

**Développement.** Le pré-BCR exprimé par les cellules pré-BII constitue un point de contrôle de la différenciation des cellules B dont BLNK est un effecteur essentiel. En effet, une déficience en BLNK conduit à une augmentation du nombre de cellules pré-BI et une absence de différenciation en cellules pré-BII qui entraîne une chute du nombre de cellules B matures. Ces perturbations correspondent à une perte de la signalisation du pré-BCR et du réarrangement V<sub>H</sub>J<sub>H</sub> ; le pré-BCR ayant été décrit pour augmenter l'expression des facteurs nécessaires à ce processus [111]. En revanche, dans les cellules de souris BLNK<sup>-/-</sup>, le défaut de différenciation n'intervient qu'à la transition entre les stades pré-BII et les cellules B immatures, suggérant la présence d'autres adaptateurs qui compenseraient le rôle de BLNK dans la signalisation du pré-BCR murin . Une autre

hypothèse émise est l'existence d'autres voies de signalisation qui prendraient le relais comme celle de l'IL-7 qui est indispensable au développement des cellules B murines et ne semble pas essentielle à la production de cellules B humaines [111-113].

**Structure.** BLNK est composée de 3 parties distinctes, à savoir une région N-terminale divisée en 2 sous-régions, l'une basique et l'autre acide, suivie de 3 domaines riches en prolines (PR) reconnus par les domaines SH3 des protéines voisines et d'un domaine SH2 du côté C-terminal (*Figure 18*). La région N-terminale basique comprend 7 résidus leucines ou isoleucines placés dans des positions "a" et "d" d'hélices  $\alpha$  communément notées "abcdefg" et où les résidus a et d sont des résidus hydrophobiques. Elle permet à BLNK d'interagir avec des protéines voisines présentant un motif similaire par un processus de surenroulement des hélices  $\alpha$ , appelé "coiled-coil". Cette région est nommée "leucine zipper" en référence au système de fermeture éclair qu'elle rappelle [114].



**Figure 18. Structure primaire de BLNK.** BLNK est constituée d'une séquence "leucine zipper" suivie d'une séquence riche en sites phospho-accepteurs tyrosines (Tyr), de trois domaines riches en prolines (PR) et d'un domaine d'homologie à Src (SH2).

De plus, 41 sites phospho-accepteurs ont été identifiés dans la séquence de BLNK exprimée par des cellules B de poulet (DT40), dont 26 résidus sérine, 6 thréonines et 9 tyrosines [115]. Six des 9 tyrosines, décrites pour être phosphorylées suite à une stimulation du BCR et pour interagir avec des protéines voisines, sont situées dans le domaine N-terminal acide de BLNK [116, 117].

**Fonctions.** N'ayant pas d'activité enzymatique, BLNK exerce une fonction d'adaptateur protéique par l'intermédiaire de ses différents domaines et est indispensable à une signalisation efficace du BCR. Le motif "leucine zipper", et plus particulièrement le résidu leucine en position 18, joue un rôle dans la localisation cellulaire de BLNK en étant responsable de son exclusion nucléaire et en permettant sa partielle localisation membranaire avant même que les cellules B ne soient activées. Ce motif permet ainsi de recruter plus rapidement BLNK dans les radeaux lipidiques avec



le BCR [114, 118]. Après activation du BCR, BLNK est transloquée à la membrane où son domaine SH2 reconnaît la tyrosine 204 de la sous-unité Ig $\alpha$  du BCR. Cette tyrosine, qui se trouve en dehors du motif ITAM, place BLNK à proximité de Syk ancrée au motif ITAM afin de faciliter sa phosphorylation [119, 120]. Les sites de phosphorylation servent alors d'ancrage à des substrats de Syk associés au BCR afin d'amplifier leur phosphorylation et de réguler différentes voies de signalisation. En effet, il a été montré que les tyrosines 84, 178 et 189 phosphorylées de BLNK lient préférentiellement PLC $\gamma$ 2, la tyrosine 96 phosphorylée est, quant à elle, reconnue par Btk et enfin la tyrosine 72 interagit avec Vav. L'accrochage de PLC $\gamma$ 2 et Btk sur la même molécule BLNK permet la formation du complexe BLNK/ Btk/PLC $\gamma$ 2 nécessaire à la signalisation calcique et à l'activation de NFAT [106, 107, 116].

Un autre rôle décrit de BLNK consiste en la limitation de la durée du complexe Syk/ppITAM au BCR activé. Par l'ancrage du domaine SH2 de BLNK à la tyrosine 630 phosphorylée de la queue C-terminale de Syk, le complexe Syk/BLNK remplace le complexe Syk/ppITAM, tout en stabilisant Syk dans une conformation ouverte et active. Cependant, BLNK n'est pas suffisante pour activer Syk, car elle est incapable de lier Syk si cette dernière n'est pas elle-même liée au BCR et donc sortie de sa conformation auto-inhibée [71].

Si il est établi que BLNK joue un rôle crucial dans le développement et les fonctions des cellules B, les deux isoformes de BLNK n'ont pas exactement le même rôle. Elles s'associent de la même façon à PLC $\gamma$ 2 pour déclencher la réponse calcique et l'activation de NFAT. Cependant, l'isoforme longue, contenant une région riche en prolines supplémentaire, est la seule à s'associer à Grb2 qui inhibe la voie des MAP kinases mitogènes, favorisant ainsi l'apoptose induite par le BCR. L'isoforme courte, quant à elle, active préférentiellement la voie NF- $\kappa$ B et la transcription de gènes tels que *c-fos* impliqués dans la prolifération cellulaire. L'équilibre entre la survie et l'apoptose des cellules B nécessite ainsi une régulation fine du splicéosome qui inclut ou exclut l'exon 8 et détermine l'expression relative de chacune des 2 isoformes [110].

### ***Btk***

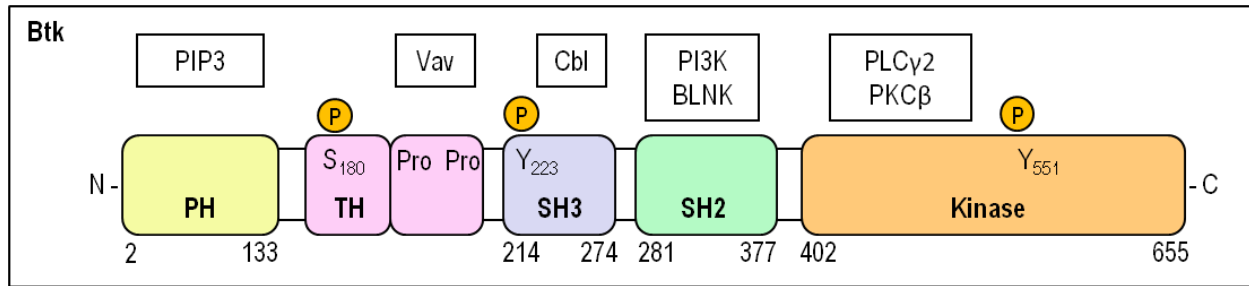
La protéine Btk (Bruton's tyrosine kinase) est une protéine tyrosine kinase cytoplasmique. Elle s'associe préférentiellement aux récepteurs présentant un motif ITAM tels que le récepteur Fc $\epsilon$ RI dans les mastocytes, le récepteur GPVI dans les plaquettes ou encore le BCR. Ainsi, elle est exprimée dans les cellules myéloïdes, les plaquettes et à tous les stades de la différenciation des

cellules B, à l'exception des plasmocytes qui n'expriment plus le BCR. Son expression n'a pas été retrouvée dans les cellules T, ni dans les cellules non-hématopoïétiques [121].

**Développement.** Btk a été identifiée en étudiant les anomalies génétiques de patients ayant un défaut dans leur développement B. Environ 85 % de ces patients étaient des hommes présentant une mutation du gène *BTK* entraînant une déficience en protéine Btk dans la majorité des cas. Le gène *BTK*, porté par le chromosome X, est le gène responsable de l'agammaglobulinémie liée à l'X (XLA). Décrite par Ogden Bruton, cette maladie se distingue par un blocage de la transition entre les stades pro-B et pré-B et se caractérise par une forte diminution de tous les isotypes d'Ig ainsi que du nombre de cellules B. Chez la souris, une mutation du gène *BTK* aboutit à un faible taux d'IgM et d'IgG3 dans le sérum alors que les taux d'IgG1 et 2 sont proches des valeurs normales. Par ailleurs, les souris déficientes en Btk ont deux fois moins de cellules B que les souris sauvages [121].

**Structure.** La séquence de Btk, longue de 659 acides aminés, se structure en différents domaines [121]. Elle s'apparente aux SFKs par la présence d'un domaine tyrosine kinase C-terminal qui contient une lysine essentielle à la liaison de l'ATP en position 430 [122]. Le domaine catalytique est précédé d'un domaine SH2 et d'un domaine SH3. Du côté N-terminal, Btk contient un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) afin pour les phosphoinositides et plus particulièrement pour le PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate). Entre les domaines PH et SH3, Btk possède un domaine TH (TEC homology), composé d'un motif Btk et de 2 domaines PR. Le motif Btk consiste en 1 résidu histidine et 3 résidus cystéines conservés formant un domaine "zinc finger" (*Figure 19*) [121, 123, 124].

La séquence de Btk contient également plusieurs résidus phosphorylables dont les tyrosines 223 et 551 et la sérine 180. La tyrosine en position 551 située dans la boucle d'activation du domaine catalytique est phosphorylée par Syk ou Lyn suite à l'activation du BCR et marque le début de l'activation de Btk caractérisée par une augmentation de son activité enzymatique [125]. Cependant, la phosphorylation de la Y<sup>551</sup> Btk par Syk n'est permise qu'en présence de BLNK et à condition que BLNK ait été elle-même phosphorylée par Syk afin de permettre son interaction avec le complexe Syk/Btk *via* le domaine SH2 de Btk [122, 126]. La tyrosine 223 située dans le domaine SH3 est le site majeur d'autophosphorylation de Btk. Elle permet la régulation de l'interaction de Btk *via* son domaine SH3 avec des protéines voisines contenant un domaine PR [127]. La sérine 180, quant à elle, située dans le domaine TH, est phosphorylée par la PKC $\beta$  qui régule négativement l'activité enzymatique de Btk [128, 129].



**Figure 19. Structure primaire de Btk.** Btk est constituée de domaines d'homologie à la Pleckstrine (PH), aux TEC (TH) (composé d'un motif Btk et de deux domaines riches en proline (Pro)), à Src (SH2 et SH3) et d'un domaine kinase. Elle contient également différents sites phospho-accepteurs avec les sérines (S) et tyrosines (Y).

**Fonctions.** La fonction principale de Btk est de phosphoryler des effecteurs en aval tels que la PLC $\gamma$ 2 [130]. L'activité kinase de Btk est nécessaire au déclenchement d'une réponse calcique suffisante et l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B ou NFAT qui induisent l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire [116, 126]. Une autre cible de Btk est la PKC $\beta$  qui, une fois phosphorylée et activée, phosphoryle à son tour Btk sur sa sérine 180 et régule ainsi négativement Btk [128].

Le domaine PH de Btk est particulièrement affiné pour le PIP3, issu de l'activité enzymatique de la PI3K suite à son activation par Syk. Le PIP3 agit alors comme un second messager qui permet le recrutement de Btk à la membrane. Ainsi, Btk se trouve à proximité des kinases Syk et Lyn responsables de sa phosphorylation et de son activation. Les domaines PR, SH3 et SH2 de Btk permettent l'interaction de Btk avec d'autres effecteurs impliqués dans la signalisation du BCR tels que Vav, PI3K ou Cbl. La localisation de Btk à la membrane est nécessaire au maintien du complexe formé autour du BCR et à l'efficacité de la signalisation en aval [123, 126, 129].

### PLC $\gamma$ 2

La PLC $\gamma$ 2 (phospholipase C gamma 2) est l'une des 13 isoformes des PLC humaines divisées en 6 familles (PLC $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$  et  $\eta$ ) et plus précisément l'une des 2 isoformes de la famille PLC $\gamma$ , l'autre étant PLC $\gamma$ 1 [131]. PLC $\gamma$ 1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires et contrôle la croissance et la différenciation cellulaires en réponse à l'activation de récepteurs membranaires ou de protéines cytoplasmiques recrutées à la membrane et dotées d'une activité tyrosine kinase. La PLC $\gamma$ 2, quant à elle, est restreinte à quelques cellules immunitaires où elle agit en aval de protéines

cytoplasmiques à activité tyrosine kinase qui sont recrutées par des récepteurs. Dans les cellules exprimant les 2 isoformes, chacune a un rôle propre et ne peut compenser l'autre en cas de déplétion [131]. Dans les cellules B, l'expression de PLC $\gamma$ 2 prime sur celle de PLC $\gamma$ 1 [132].

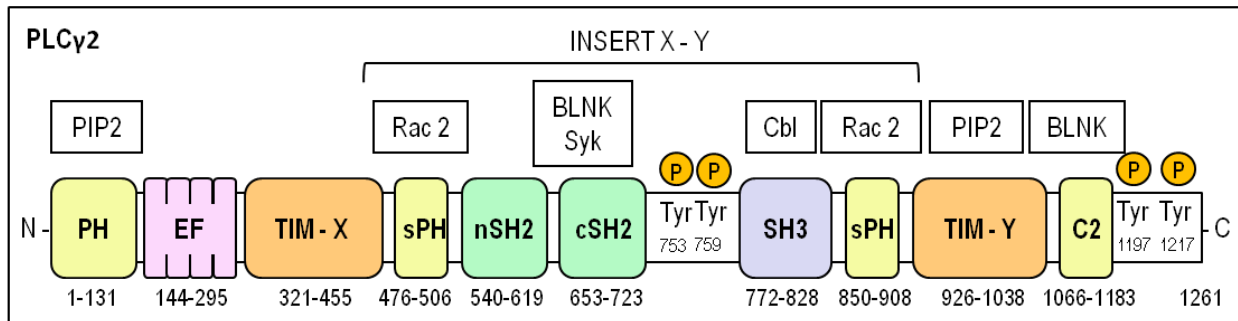
**Développement.** Des études menées chez la souris ont montré qu'un défaut d'expression de PLC $\gamma$ 1 est létal tandis que celui de PLC $\gamma$ 2 ne l'est pas. Bien que l'hématopoïèse des autres cellules soit quasiment normale, les souris PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> présentent un défaut du développement B qui se manifeste par un arrêt au stade pro-B et par un déficit en cellules B1. La forte diminution des taux d'IgM, d'IgG2a et d'IgG3 sériques et l'absence d'influx calcique en réponse à une activation du BCR conduisent à une immunodéficience sévère. La phosphorylation de Btk et BLNK dans les cellules B de souris PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> n'étant pas affectée par une stimulation antigénique et les phénotypes des souris PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> et Btk<sup>-/-</sup> ou BLNK<sup>-/-</sup> étant similaires, ces données montrent que PLC $\gamma$ 2 agit en aval des deux autres protéines dans la signalisation du BCR [133].

**Structure.** Les PLC $\gamma$ 1 et 2 présentent 50 % d'homologie dans leur séquence primaire. Leur structure est particulièrement complexe avec de nombreux domaines. Toutes les PLC ont un même core structural avec un domaine PH N-terminal, 4 domaines EF, un domaine catalytique TIM (triosephosphate isomerase) comprenant 2 unités X et Y, un domaine C2 et une queue N-terminale. Le domaine PH est affiné pour le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) et permet l'ancrage des PLC $\gamma$  à la membrane. Les domaines EF lient généralement les ions Ca<sup>2+</sup> et confèrent une certaine flexibilité à la région située entre les domaines PH et catalytique. Enfin, le domaine catalytique permet la conversion du PIP2 en IP3 (inositol-1,4,5-trisphosphate) et DAG (diacylglycerol) [131, 132].

Dans le cas de PLC $\gamma$ 2, les 2 sous-unités X et Y du domaine catalytique sont séparées par un insert particulièrement long qui double la taille du core protéique. Cet insert comprend un domaine PH coupé en deux demi-domaines (sPH<sub>n</sub> et sPH<sub>c</sub> pour split PH du côté N- ou C-terminal) logés à chacune de ses extrémités. Entre ces 2 domaines sPH se trouvent 2 domaines SH2 (cSH2 et nSH2) et un domaine SH3 [134, 135]. En dehors de ces motifs structuraux, PLC $\gamma$ 2 est dotée de 2 résidus tyrosines phospho-accepteurs en position 753 et 759 dans l'interdomaine reliant les domaines cSH2 et SH3 et 2 autres tyrosines (Y1197 et Y1217) dans la queue N-terminale (*Figure 20*).

En absence de stimuli, le domaine cSH2 interagit avec le domaine catalytique pour configurer l'enzyme dans un état inactif [136] et le domaine sPH participe au maintien de cet état de repos

[135]. L'insert confère donc un état d'auto-inhibition à la PLC $\gamma$ 2. Le domaine SH3 ne semble pas impliqué dans ce processus mais il participerait à une conformation pré-activée de PLC $\gamma$ 2 en s'associant aux domaines PR de BLNK [129] et régulerait l'expression de PLC $\gamma$ 2 en permettant son interaction avec Cbl. La phosphorylation de la tyrosine 759, reconnue par le domaine cSH2, entraîne un changement conformationnel de la protéine en libérant le domaine catalytique et en supprimant ainsi la régulation négative du domaine cSH2 [131, 135].



**Figure 20. Structure primaire de PLC $\gamma$ 2.** PLC $\gamma$ 2 est constituée de domaines d'homologie à la pleckstrine (PH et sPH) et à Src avec 2 domaine SH2 N- et C-terminal (nSH2 et cSH2) et un domaine SH3. Elle est également composée de domaines EF hands (EF), catalytiques triosephosphate isomerase (TIM X et Y), de liaison au calcium (C2) et de plusieurs sites phospho-accepteurs tyrosines (Tyr).

Le domaine nSH2 lie BLNK et entraîne la translocation de PLC $\gamma$ 2 aux membranes, notamment dans les radeaux lipidiques, où elle est activée [122, 137, 138]. En liant la tyrosine phosphorylée en position 119 de BLNK, le domaine C2, dépendant du calcium, stabilise l'interaction entre PLC $\gamma$ 2 et BLNK [117]. Cette interaction placerait PLC $\gamma$ 2 à proximité de Btk et Syk, déjà associés à BLNK après stimulation du BCR, facilitant sa phosphorylation [126]. Le recrutement de PLC $\gamma$ 2 dans les radeaux lipidiques, où résident le BCR, Lyn, BLNK, Btk et Syk suite à la stimulation, est une condition nécessaire à sa phosphorylation et au déclenchement d'une réponse calcique efficace [139].

**Fonctions.** La PLC $\gamma$ 2 possède une activité lipase qui consiste à cliver les phospholipides avant le groupement phosphate. Une fois activée, la PLC $\gamma$ 2 catalyse l'hydrolyse du PIP2 de la membrane pour produire du DAG et de l'IP3 soluble. Le DAG, quant à lui, permet l'activation de nombreuses isoformes des PKCs [131]. L'IP3 libéré dans le cytoplasme stimule les récepteurs à l'IP3 situés à la surface du réticulum endoplasmique (RE) et entraîne une augmentation de la concentration calcique intracellulaire requise pour l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NFAT impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire [116, 130]. Les tyrosines 753 et 759 sont

préférentiellement phosphorylées par Btk *in vivo* et sont indispensables à l'activité enzymatique de PLC $\gamma$ 2 et à la signalisation calcique [140, 141]. La tyrosine 1217 est, quant à elle, phosphorylée par Syk ou Lyn dans les cellules B et cette phosphorylation n'est pas liée à l'activité lipase [141]. Les petites protéines G à activité GTPasique telles que Rac2 contribuent également au changement de conformation de la PLC $\gamma$ 2 en se liant à son domaine SPH [131].

En dehors de leur activité lipase, les PLC $\gamma$  sont également dotées d'autres activités biologiques. Dans les cellules B, PLC $\gamma$ 2 est impliquée dans la seconde phase de l'influx calcique, à savoir dans l'entrée du calcium extracellulaire. En effet, si les cellules déficientes en PLC $\gamma$ 2 (et n'exprimant pas PLC $\gamma$ 1) voient ce second influx calcique disparaître, l'expression d'un mutant de PLC $\gamma$ 2 déficient en activité lipase le restaure. Ce rôle serait attribué au domaine SH3 de PLC $\gamma$ 2 par analogie fonctionnelle avec PLC $\gamma$ 1 dont le même domaine permet de déclencher l'entrée de calcium extracellulaire dans les cellules neuronales [142].

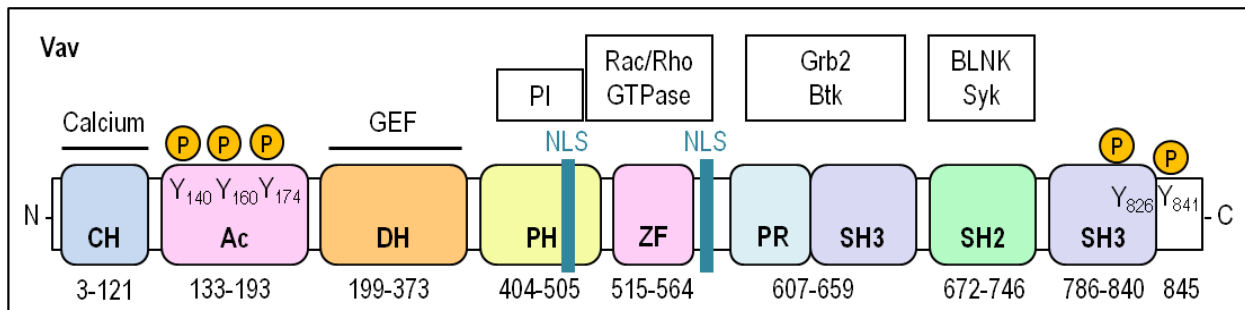
### **Vav1**

Les protéines de la famille Vav sont des protéines à activité GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui sont capables d'échanger un nucléotide GTP avec un GDP. La famille Vav comprend 3 membres, Vav1, Vav2 et Vav3 qui sont codés par 3 gènes différents. Vav1 est spécifique des cellules hématopoïétiques tandis que Vav2 et Vav3 sont ubiquitaires. Elles appartiennent à la superfamille des protéines DBL (diffuse B-cell lymphoma) qui compte plus de 80 membres chez l'homme et facilite l'activation des petites protéines G à activité GTPasique. Les substrats spécifiques de Vav1 sont les GTPases (guanosine triphosphatases) de la famille Rho [143].

**Développement.** Contrairement à Vav2 et Vav3 dont l'absence n'affecte pas la lymphopoïèse, Vav1 joue un rôle important dans le développement des cellules T et B1 murines. Les souris triple déficientes en Vav produisent peu de cellules B matures circulantes et MZ. Une déficience en Vav n'affecte pas le développement des cellules B jusqu'au stade T1, en revanche elles affectent le nombre et la survie des cellules B matures. Chez l'homme, la famille Vav, et Vav1 en particulier, joue un rôle important dans le développement et la maintenance des systèmes hématopoïétiques et immunologiques [143, 144].

**Structure.** Vav1 est codée par un gène situé sur le chromosome 19 et comprenant 27 exons. Longue de 845 acides aminés, elle a un poids moléculaire d'environ 98 kDa et sa structure est

composée de différents domaines (*Figure 21*). Du côté N-terminal existe un domaine d'homologie à la calponine (CH) qui fonctionne habituellement comme un domaine de liaison à l'actine mais qui, dans le cas de Vav1, est impliqué dans la mobilisation du calcium. Ce domaine CH est suivi d'une région acide (Ac) contenant plusieurs tyrosines phosphorylables impliquées dans la régulation de la protéine. Le domaine d'homologie à Dbl (DH) correspond au domaine catalytique qui permet la réaction d'échange de GDP/GTP avec les protéines Rac. S'en suit un domaine PH qui concède à Vav1 une interaction avec les phospholipides membranaires nécessaire au bon fonctionnement de l'activité catalytique du domaine DH [143, 145]. Le domaine "Zinc Finger" (ZF), riche en cystéines, est impliqué dans l'activation du domaine catalytique. Les domaines PR et SH3 N-terminaux semblent interagir afin d'exposer une interface hydrophobe reconnue par Grb2. Le domaine SH3 N-terminal permet également l'interaction avec Btk *via* ses 2 domaines PR contenus dans le domaine TH. Le domaine SH2 peut lier la tyrosine 391 du CD19 [146], la tyrosine 72 de BLNK [106, 146] ou encore les tyrosines 348 et 352 de Syk. Vav1 est capable d'interagir avec Syk phosphorylée uniquement sur le résidu 352 mais l'interaction est plus forte lorsque les 2 résidus sont phosphorylés [59, 147]. Le domaine SH3 C-terminal est requis pour d'autres interactions. En plus des 3 tyrosines du domaine acide, Vav1 contient 4 tyrosines du côté C-terminal; les tyrosines 826 et 836 sont contenues dans le domaine SH3 C-terminal et les tyrosines 841 et 844 sont situées dans la queue C-terminale. Les tyrosines 826 et 841, respectivement phosphorylables par Csk ou une SFK, sont de meilleurs phospho-accepteurs et ne sont pas conservées dans les séquences de Vav2 et Vav3, suggérant qu'elles puissent être importantes pour des fonctions spécifiques de Vav1 [148].



**Figure 21. Structure primaire de Vav1.** Vav1 est constituée de plusieurs domaines dont un acide (Ac), un en doigts de Zinc (ZF) et un riche en prolines (PR). Elle est également composée de domaines d'homologie à la calponine (CH), à Dbl (DH), à la pleckstrine (PH) et à Src (SH2 et SH3). Elle contient aussi 2 signaux de localisation nucléaire (NLS) et plusieurs résidus tyrosines phospho-accepteurs (Y).

Au repos, la tyrosine 174 de l'hélice du domaine acide est stabilisée par des résidus du domaine DH conduisant Vav1 dans une conformation auto-inhibitrice avec un site actif masqué. En

réponse à un stimulus, la tyrosine 174 est phosphorylée par Syk ou une SFK et libère l'hélice auto-inhibitrice exposant le site actif du domaine DH [146, 149]. Les domaines PH et ZF contribueraient à l'efficacité de l'activité GEF en stabilisant le domaine DH complexé à Rac [145].

Vav1, qui est plutôt cytoplasmique, contient également 2 signaux de localisation nucléaire (NLS) qui peuvent lui permettre d'être transloquée dans le noyau [145]. Cependant, il a été montré dans les mastocytes que seule la séquence NLS, située dans le domaine PH, est fonctionnelle [150].

**Fonctions.** Vav1 est un proto-oncogène exprimé majoritairement dans les cellules hématopoïétiques. Elle a été découverte par son pouvoir transformant *in vitro*. Cette forme oncogénique s'est révélée être une forme tronquée (délétion des 67 premiers acides aminés) de la protéine sauvage qui, elle, est peu transformante [151]. En dehors de son expression dans les cellules hématopoïétiques, Vav1 est exprimée de façon ectopique dans différentes cellules tumorales telles que les neuroblastomes [152] et les cellules du cancer du pancréas [153], de certains cancers du poumon [148] ou encore de certains cancers du sein [154].

Vav1 est activée suite à une stimulation du TCR mais aussi du BCR, du FcRI, des intégrines, des récepteurs aux cytokines ou aux facteurs de croissance. Elle est impliquée dans le réarrangement du cytosquelette d'actine et coopère avec PLC $\gamma$ 2 pour propager le phénomène de "spreading" des cellules B suite à une stimulation du BCR [155] et contribuer à la formation de la synapse immunologique [156]. L'activation de Rac par Vav1 est nécessaire à l'activation de Btk et des protéines en aval, PLC $\gamma$ 2 et PI3K [131, 146]. Vav1 joue également un rôle dans la réponse calcique et l'activation du facteur de transcription NFAT, indépendamment de son activité GEF [143]. En effet, la phosphorylation de la tyrosine 826 régule négativement l'activité de NFAT [148].

### **PI3K**

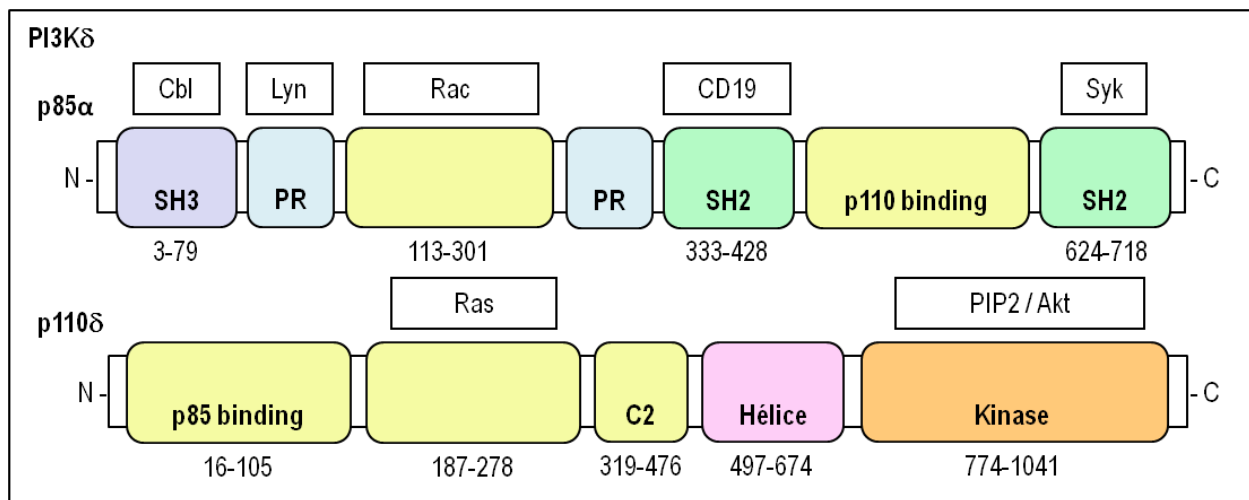
Les phosphoinositides 3-kinases (PI3K) sont une famille d'enzymes divisée en 3 classes (I, II et III). La classe IA comprend les PI3Ks activées par des tyrosines kinases associées à des récepteurs, en réponse à un antigène. Ces PI3Ks sont des hétérodimères composées d'une sous-unité régulatrice (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  ou p55 $\gamma$ ) et d'une sous-unité catalytique (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  ou p110 $\delta$ ). Les sous-unités p85 $\alpha$  et p110 $\delta$  sont les principaux effecteurs des PI3K en aval du BCR [157].

**Développement.** Les souris déficientes en p85 $\alpha$  présentent un blocage partiel au stade pré-B avec une diminution du nombre de cellules B, dont les B1, et meurent rapidement après la



naissance. Les souris déficientes en p110 $\delta$  survivent mais présentent un défaut de développement des cellules B MZ et des cellules B1. Les souris déficientes en p85 $\alpha$  et p110 $\delta$  produisent peu d'anticorps sériques et sont incapables de déclencher une réponse immunitaire [157].

**Structure.** La sous-unité p85 $\alpha$  permet des interactions avec plusieurs protéines dont certaines régulent l'activité catalytique de la PI3K. Son domaine SH3 lie les domaines PR de Cbl alors que ses 2 domaines SH2 s'associent au co-récepteur CD19 du BCR ou à la protéine adaptatrice BCAP (B-cell PI3K adaptor protein) [158]. Le domaine cSH2 de PI3K interagit avec la tyrosine 323 phosphorylée de Syk dans les cellules B, le même résidu décrit pour servir d'ancrage à Cbl [159]. Elle compte également 2 domaines PR de chaque côté d'un domaine de liaison à Rac. Enfin, elle contient une séquence de liaison à p110 $\delta$  [158] dont la séquence C-terminale contient le domaine kinase qui convertit le PIP2 en PIP3. Celui-ci est précédé d'un domaine en hélice, d'un domaine C2, d'un domaine de liaison à Ras et enfin du domaine de liaison à p85 $\alpha$  du côté N-terminal (*Figure 22*) [158].



**Figure 22. Structure de la PI3K $\delta$ .** La sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  contient deux domaines riches en proline (PR), deux domaines SH2, un domaine SH3 et un domaine de liaison à la sous-unité p110. La sous-unité catalytique p110 $\delta$  contient un domaine de liaison à la sous-unité p85, un domaine de liaison au calcium (C2), un domaine riche en hélices et un domaine kinase.

Dans les cellules B, PI3K $\delta$  est régulée par le CD19 ou BCAP. Une fois phosphorylées, ces protéines servent d'ancrage à p85 $\alpha$  et permettent ainsi le recrutement de p110 $\delta$  à la membrane où elle catalyse la conversion du PIP2 en PIP3. Les domaines PR et SH3 de p85 peuvent interagir

facilement avec les protéines voisines. Une interaction directe entre p110 et Ras activée contribue à l'activation de PI3K. Le CD19 n'est pas indispensable à l'activation de PI3K mais il permet le maintien de son activation après stimulation du BCR [157].

La PI3K porte des tyrosines et des sérines phosphorylables sur ses deux sous-unités qui sont peu étudiées. Un résidu sérine en position 1039 de la sous-unité catalytique p110 $\delta$  a été décrit pour être autophosphorylé *in vitro* et réguler négativement l'activité kinase de la PI3K [160].

**Fonctions.** La classe I des PI3Ks convertit le PIP2 de la membrane plasmique en PIP3. Ce dernier permet de recruter à la membrane des protéines contenant un domaine PH affin pour ce phospholipide, comme la sérine/thréonine kinase Akt (ou PKB) dont le rôle est important dans la prolifération, la croissance et la survie de nombreux types cellulaires. Cependant, les cellules B expriment aussi Btk qui contient également un domaine PH affin pour le PIP3 et qui est donc un autre effecteur de PI3K [157]. En effet, une fois recrutée à la membrane, Btk se trouve alors à proximité de PLC $\gamma$ 2 qu'elle peut phosphoryler afin de compléter son activation et de déclencher la réponse calcique [158]. Par ailleurs, la sous-unité p85 régule la sous-unité catalytique en interagissant avec la protéine Rac *via* son domaine Rho-GAP ou BH (BCR-homology). Ainsi, Rac pourrait être l'un des activateurs de la sous-unité catalytique [157].

Les 2 sous-unités de PI3K coopèrent pour réguler la formation des complexes à la membrane et ainsi les voies de signalisation en aval du BCR. Deux phosphatases, PTEN et SHIP, modulent l'activité de PI3K en déphosphorylant les produits de PI3K [158].

#### **I.2.2.2.3. Régulateurs négatifs**

Suite à une stimulation antigénique, les complexes formés peuvent s'associer à des régulateurs négatifs tels que les phosphatases, qui contrebalancent l'activité des kinases, ou des ubiquitines ligases, qui permettent la dégradation rapide des protéines. Cette régulation contrôle ainsi l'intensité et la durée du signal émis.

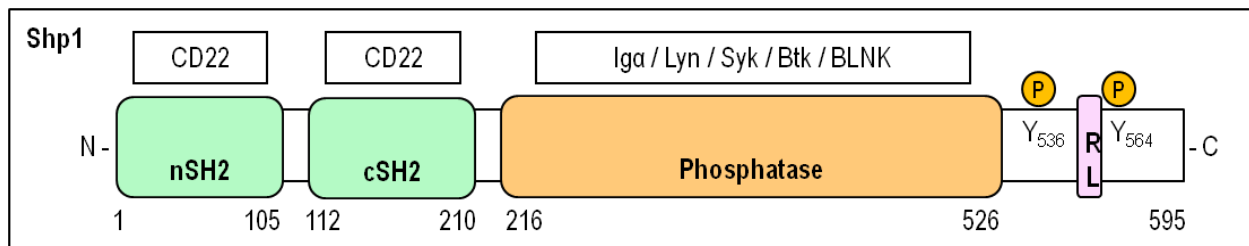
##### ***Shp1***

La tyrosine phosphatase Shp1 (Src Homology 2 domain-containing phosphatase 1) ou PTPN6 (Protéine Tyrosine Phosphatase, Non-récepteur de type 6) appartient à la famille des tyrosines phosphatases. Ce régulateur négatif est exprimé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques

et semble être la principale phosphatase impliquée dans la neutralisation de l'activité des kinases Lyn et Syk. L'autre membre de la famille Shp, Shp2, a une expression ubiquitaire et agit généralement comme un régulateur positif dans les autres types cellulaires [130].

**Développement.** Les souris déficientes en Shp1 présentent une splénomégalie ainsi qu'une accumulation de cellules myéloïdes et de monocytes. La lymphopoïèse subit également des troubles sévères avec une involution prématurée du thymus, une forte diminution du nombre de cellules B-2 et une augmentation du nombre de cellules B-1. Ces défauts mènent, entre autres, à de sévères maladies auto-immunes [161, 162].

**Structure.** La protéine Shp1 présente 2 domaines SH2 du côté N-terminal, suivis d'un domaine catalytique tyrosine phosphatase puis d'une queue C-terminale [161] dans laquelle existent 2 résidus tyrosines, un signal de localisation nucléaire (décrit dans les cellules non-hématopoïétiques) et un signal de localisation dans les radeaux lipidiques (RL) (*Figure 23*) [163]. Au repos, le domaine nSH2 de Shp1 s'insère dans le site actif de son domaine phosphatase, bloquant ainsi son éventuelle liaison avec un substrat. Lorsque ses deux domaines SH2 lient les tyrosines phosphorylées d'un récepteur à motif ITIM, comme le CD22, Shp1 subit un réarrangement conformationnel qui libère le site actif du domaine catalytique. La phosphorylation des tyrosines 564 ou 536 par Lyn augmente l'activité phosphatase de Shp1 [163, 164].



**Figure 23. Structure de Shp1.** Shp1 est constituée de deux domaines SH2 (nSH2 et cSH2), d'un domaine phosphatase et d'un domaine de localisation dans les radeaux lipidiques (RL) ainsi que de plusieurs sites phospho-accepteurs tyrosines (Y).

**Fonctions.** En absence de stimulation du BCR, Shp1 est associée aux motifs ITAMs du BCR, la maintenant dans un état déphosphorylé. Suite à l'engagement du BCR, le signalosome se forme autour de Syk, Shp1 se dissocie du BCR et est alors recrutée aux motifs ITIMs contenus dans les séquences des co-récepteurs du BCR tels que le CD22 phosphorylé par Lyn. Shp1, à proximité du BCR et de ses effecteurs, peut alors déphosphoryler les sous-unités Igα et Igβ du BCR ainsi que la

tyrosine kinase Lyn. Shp1 pourrait également enlever les modifications par phosphorylation sur les protéines Syk, Btk et BLNK, dissociant les complexes formés autour du BCR. Cette phosphatase permet ainsi d'atténuer ou de mettre un terme à la transmission du signal même si l'interaction entre Shp1 et ces 3 protéines n'a pas été clairement établie [9, 129, 162, 165].

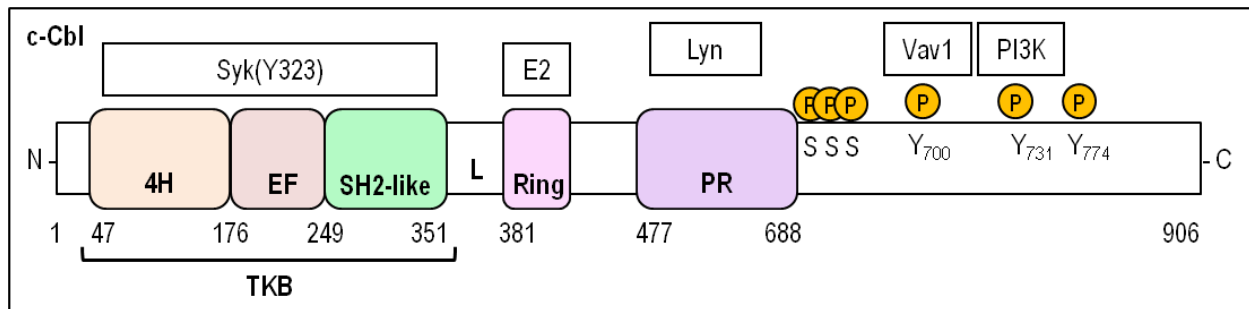
## *Cbl*

Les protéines Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) appartiennent à la famille des E3 ubiquitines ligases qui modifient leurs substrats protéiques en créant une liaison covalente entre un résidu lysine de leur cibles et l'ubiquitine. Ce type de modification post-traductionnelle permet, entre autres, d'étiqueter les protéines devant être dégradées par le protéasome 26S. Elles agissent donc comme des régulateurs négatifs. Parmi les trois membres existants chez les mammifères, deux d'entre eux sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques, c-Cbl et Cbl-b [166].

**Développement.** La génération de souris invalidées pour les 2 gènes c-Cbl et Cbl-b montre un défaut de maturation des lymphocytes B avec deux fois plus de cellules B1 et MZ. Malgré un taux d'IgM sérique cinq fois plus élevé, ces souris ne déclenchent pas de réponse immunitaire excessive suite à une stimulation antigénique mais développent des maladies auto-immunes en produisant des auto-anticorps, démontrant le rôle important de Cbl dans l'induction de la tolérance immune [166, 167].

**Structure.** c-Cbl est une protéine cytoplasmique de 906 acides aminés (120 kDa) dont l'expression est ubiquitaire et particulièrement élevée dans les cellules hématopoïétiques. Malgré une séquence en acides aminés plus longue (982 aa), Cbl-b possède une structure similaire à celle de c-Cbl. Ces 2 protéines contiennent un domaine N-terminal constitué de 4 hélices (4H) suivi d'un domaine EF de liaison au calcium et d'un domaine SH2 atypique (SH2-like). L'ensemble de ces 3 domaines constituent le domaine TKB (Tyrosine Kinase Binding) qui est un domaine SH2 « spécialisé » reconnaissant les tyrosines phosphorylées de substrats spécifiques. Ce domaine est requis au processus d'ubiquitination qui est assuré par le "RING finger" dont le rôle consiste à transférer directement l'ubiquitine de l'E2 vers le substrat. La partie C-terminale des séquences Cbl contient un domaine PR suivi, dans c-Cbl, d'une petite région riche en sérines phosphorylées par les PKCs (*Figure 24*) [168]. Cbl contient également de nombreuses tyrosines parmi lesquels les résidus 700, 731 et 774 sont les sites majeurs de phosphorylation de Syk et Lyn. La tyrosine 700 peut servir

d'ancrage à Vav1 et la tyrosine 731, spécifique à c-Cbl, peut lier la PI3K [168]. Le domaine TKB permet à Cbl de lier la tyrosine 323 de Syk, préalablement phosphorylée par Lyn [82, 91, 169, 170].



**Figure 24. Structure primaire de c-Cbl.** Cbl comprend un domaine TKB (Tyrosine Kinase Binding) qui est constitué de quatre hélices (4H) suivies de domaines de liaison au calcium "EF hands" (EF) et SH2 atypique (SH2-like). En tant que E3 ligase, elle comprend également un domaine "RING finger" (Ring) qui précède un domaine riche en prolines (PR) et de nombreux sites phospho-accepteurs sérines et tyrosines (S et Y).

**Fonctions.** En tant que E3 ligase, la fonction principale de c-Cbl ou Cbl-b consiste à transférer directement l'étiquette « ubiquitine » d'une enzyme de conjugaison E2 sur un résidu lysine d'une protéine dotée préférentiellement d'une activité tyrosine kinase (récepteur ou non) et activée, telles que Syk ou Lyn. Cet étiquetage permet la dégradation des protéines ciblées par les lysosomes ou le protéasome, argumentant en faveur du rôle de Cbl comme régulateur négatif de la signalisation [168]. Décrit pour interagir avec le BCR, Syk et ses principaux effecteurs (PLC $\gamma$ 2, PI3K, Vav et BLNK), Cbl n'est impliqué dans le processus d'ubiquitination que de la sous-unité Ig $\alpha$  et Syk. Son rôle de régulateur négatif ne concerne que les événements précoces de la cascade de signalisation du BCR [171]. Cependant, c-Cbl et Cbl-b ont été décrits pour ubiquitiner Vav et PI3K dans les cellules T, suggérant que les cibles de Cbl dépendraient du contexte cellulaire [172].

Cbl peut également jouer un rôle de régulateur positif en augmentant la survie et la prolifération cellulaire par une voie de signalisation dépendante de PI3K suite à une stimulation par des cytokines. Il pourrait rediriger les protéines mono-ubiquitinées vers d'autres processus que la dégradation pour laquelle la poly-ubiquitination est requise [168]. Dans les plaquettes, c-Cbl induit l'ubiquitination de Syk mais les molécules ubiquitinées ne sont pas dégradées [172]. Cbl pourrait également fonctionner différemment au cours de la maturation des cellules B. Si c-Cbl et Cbl-b semblent avoir des rôles redondants dans les cellules B matures, c-Cbl régule négativement la signalisation du BCR dans les cellules B immatures de poulet (DT40) alors que Cbl-b régule

positivement la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 par Btk dans ce même modèle. La phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 n'étant plus affectée par l'expression de Cbl-b dans les cellules B matures, Cbl-b et c-Cbl pourraient d'abord avoir des rôles opposés sur des cibles différentes avant d'avoir des rôles similaires sur la régulation de Syk dans les cellules B matures [173].

### **I.2.3. Voies d'activation conduisant à l'homéostasie**

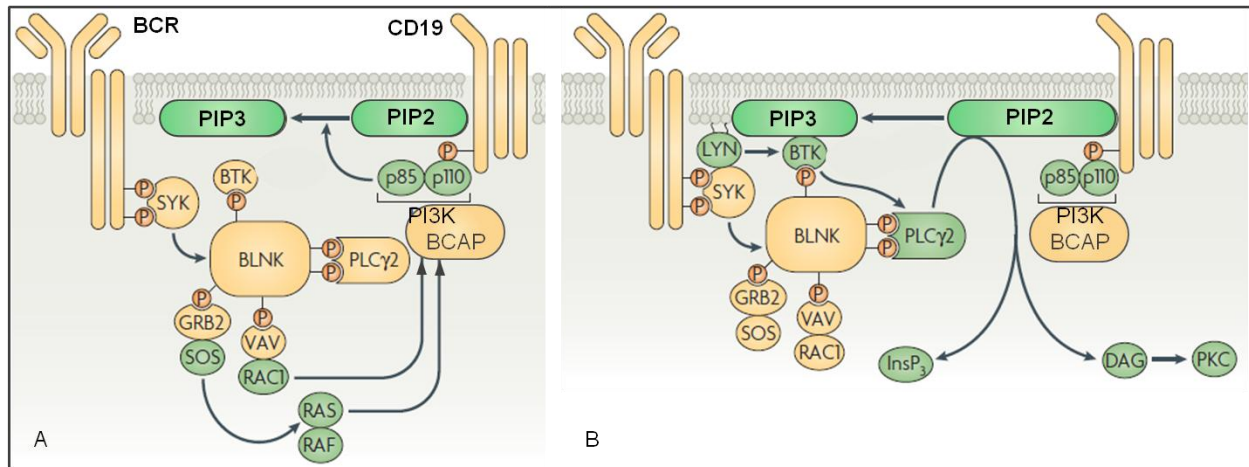
L'activation des cellules B initiée par la liaison d'un antigène au BCR, provoque une série de signaux qui aboutissent à divers processus tels que la survie cellulaire ou l'apoptose, la prolifération ou la différenciation, la migration ou plus spécifiquement la production d'anticorps.

#### **I.2.3.1. Messagers secondaires et réponse calcique**

Après l'initiation de la phosphorylation des motifs ITAMs des sous-unités Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  par Lyn, Syk se lie au BCR et devient le premier effecteur de la cascade de signalisation du BCR. Elle phosphoryle alors des protéines adaptatrices telles que BLNK ou BCAP qui viennent réguler les effecteurs en aval. Les complexes formés autour de ces protéines adaptatrices sont recrutés à la membrane, et plus précisément dans les radeaux lipidiques, où ils vont eux-mêmes activer des enzymes du métabolisme lipidique. PLC $\gamma$ 2 et PI3K $\delta$  constituent les deux voies principales en aval du BCR aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NFAT et NF- $\kappa$ B [174].

Une première voie de signalisation déclenchée par Syk entraîne l'activation de facteurs de transcription *via* le métabolisme du PIP2 impliquant PLC $\gamma$ 2. Dans cette voie, Syk phosphoryle la protéine adaptatrice BLNK sur différents résidus tyrosines qui servent d'ancrage à Btk puis à PLC $\gamma$ 2. Ce complexe membranaire Syk/BLNK/Btk/PLC $\gamma$ 2 est reconnu par Vav1 qui est phosphorylée par Syk et permet une activation de Rac. La forme de Rac qui lie le GTP rejoint alors un complexe formé autour de BCAP et active la PI3K- $\delta$  (*Figure 25.A*) [174, 175].

La seconde voie de signalisation du BCR, dépendante de Syk, implique PI3K $\delta$ . Syk et Btk phosphorylent la protéine adaptatrice BCAP sur différents résidus permettant l'ancrage de PI3K $\delta$ . Le complexe est recruté à la membrane où PI3K $\delta$  est phosphorylée par Btk et activée par Rac-GTP, préalablement activée par Vav. PI3K $\delta$  convertit le PIP2 en PIP3 et permet le recrutement d'Akt/PKB et du complexe autour de Btk à la membrane (*Figure 25.B*) [174, 175].



**Figure 25. Complexes d'activation autour du BCR (adapté de Scharenberg et al., 2007) [175]. A)** Suite à une stimulation du BCR, BLNK est recrutée et phosphorylée par Syk, générant des sites de liaison pour différents effecteurs tels que Btk, PLCγ2, Vav et Grb2. Vav active alors Rac qui rejoint le complexe formé par BCAP et active PI3K. B) Par la phosphorylation du PIP2 en PIP3, la PI3K activée permet le recrutement à la membrane de Btk qui phosphoryle et active PLCγ2 qui clive le PIP2 en IP3 et en DAG.

Suite à sa phosphorylation par Syk et Btk, PLCγ2 activée convertit le PIP2 en messagers secondaires que sont l'IP3 et le DAG. Ce dernier permet l'activation d'une part de différentes isoformes des PKCs impliquées dans la voie NF-κB et d'autre part de Ras-GTP dans la voie MAPK. L'IP3, quant à lui, est libéré dans le cytoplasme, se fixe sur ses récepteurs situés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et libère le calcium stocké dans la lumière de cet organelle. Cependant, la capacité limitée du RE donne naissance à un influx calcique transitoire qui doit être suivi d'un second influx en provenance du milieu extracellulaire. L'ensemble de ces influx calciques contribue à maintenir un niveau de réponse suffisant pour activer la voie NFAT [174-176].

### 1.2.3.2. Réponses cellulaires

Dans les cellules B stimulées, l'activation de NFAT et NF-κB, est en partie responsable de l'homéostasie. En effet, en fonction de la durée et de l'intensité de la réponse calcique, ces deux principales voies aboutissent soit à la survie et/ou à la prolifération, soit à l'apoptose [176].

Comme décrit précédemment, l'IP3 permet un relargage faible et transitoire de calcium intracellulaire qui permet un second influx provenant de l'extérieur. Ce second influx varie en fonction de la stimulation antigénique et détermine l'activation de NFAT et /ou de NF-κB [175].

Un intense signal déclenché par un antigène spécifique du BCR entraîne une sélection positive des cellules B. Lyn phosphoryle les motifs ITAM des récepteurs et déclenche une cascade de signalisation en aval du BCR. Par ailleurs, Lyn phosphoryle également le CD19 qui augmente la réponse calcique en diminuant le seuil d'activation de la signalisation du BCR. Une fois les PKCs recrutées à la membrane par le DAG, l'influx calcique initial fort et transitoire permet leur activation complète. Ces dernières entraînent la phosphorylation d'IKK qui envoie I $\kappa$ B vers la dégradation et libère ainsi NF- $\kappa$ B qui est transloqué dans le noyau et induit l'expression de gènes tels que Bcl-2, Cycline D ou encore CDK4 impliqués dans la survie et la prolifération cellulaires. Après le pic initial, l'influx calcique persiste, tout en devenant plus faible et plus soutenu et permettant l'activation de la calmoduline. Elle recrute alors la calcineurine phosphatase qui déphosphoryle NFAT et permet la translocation de ce facteur de transcription dans le noyau où il induit l'expression de gènes impliqués également dans la survie et la prolifération cellulaire [174-177].

Un auto-antigène de faible affinité pour le BCR entraîne la sélection négative des cellules B. En effet, l'influx calcique est transitoire et permet l'activation de NF- $\kappa$ B seulement qui induit l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques et ainsi l'apoptose des cellules B. Dans le cas d'un antigène de faible affinité pour le BCR et capable d'apporter une stimulation soutenue, il existe un influx calcique sinusoïdal qui permet l'activation de NFAT uniquement et la survie des cellules B [175].



## **II. ALTERATION DE L'HOMÉOSTASIE DES CELLULES B : LA LLC**

Une dérégulation de l'homéostasie des cellules B, causée par une altération de la cascade de signalisation du BCR, peut mener à une augmentation de la survie cellulaire dans certaines pathologies comme la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC).

### **II.1. Déséquilibre de l'homéostasie dans la LLC**

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est la leucémie la plus fréquente en Europe occidentale [178], touchant principalement les personnes de plus de cinquante ans. Cette hémopathie, dite clonale, est caractérisée par une accumulation de cellules B CD5<sup>+</sup> dans le sang, la moelle et les OLS conduisant à une hyper-lymphocytose, accompagnée d'une lymphopathie et d'une splénomégalie.

#### **II.1.1. Origine et facteurs cliniques**

L'évolution clinique de la LLC est très variable. Certains patients présentent une forme indolente de la maladie et vivent des années sans traitement alors que d'autres développent une forme agressive de cette hémopathie et nécessitent une thérapie [179, 180]. Il est important de noter que, malgré les traitements actuels qui permettent un ralentissement de la progression tumorale, cette leucémie reste incurable. Toutefois, quelques rares cas de régression spontanée chez des patients présentant une leucémie caractérisée par un bon pronostic (facteurs pronostiques favorables) ont été décrits [181].

##### **II.1.1.1. Origine**

La LLC touche les cellules B matures qui, au lieu d'être poly-clonales, sont généralement mono- voire oligo-clonales. En effet, les HSC présentent un développement normal avec certaines cellules qui entrent dans la différenciation lymphoïde. S'il existe un nombre plus élevé de cellules pro-B chez les patients atteints de LLC, elles subissent normalement le réarrangement VDJ et offrent une population poly-clonale. C'est donc lors de la sélection clonale, dans les cellules B matures activées, que les cellules B de LLC restreignent leur répertoire. Cependant, des événements primaires tels que l'augmentation de facteurs de transcription lymphoïdes dès le stade HSC ou l'apparition de mutations acquises dans les cellules MPP de la majorité des patients, déterminent déjà le devenir tumoral des cellules de LLC [182, 183].

### II.1.1.2. Stades

La LLC est une pathologie hétérogène qui est définie sur le plan clinique par différents degrés d'évolution. Après Rai en 1975, Binet publie en 1981 une classification des stades de la LLC (A, B et C) qui est basée sur la présentation clinique (aires ganglionnaires) et l'existence de cytopénies (numération des plaquettes et taux d'hémoglobine) [184, 185]. Cette classification permet de définir l'état de gravité de la maladie (les patients aux stades B ou C sont considérés comme des patients présentant une forme évolutive) mais n'est pas prédictible du devenir des patients au stade A.

En 2014, le groupe allemand GCLLSG (German CLL Study Group) publie une nouvelle table de score pronostique plus discriminante incluant de nouveaux facteurs pronostiques ayant un impact sur la survie globale du patient et validés au sein de différentes cohortes. En plus du sexe et de l'âge du patient, cette table tient compte de facteurs génétiques tels que le statut mutationnel des IgVH et les délétions 17p et 11q ainsi que de marqueurs sériques tels que les concentrations de thymidine kinase et de  $\beta$ -2-microglobuline [186, 187]. Dans la plupart des cas, la délétion 11q affecte le gène *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) qui code pour une protéine importante dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN et cause une instabilité génomique. La délétion 17p perturbe le gène suppresseur de tumeur *TP53* codant pour la protéine p53 impliquée dans l'apoptose [188].

### II.1.1.3. Caractéristiques de la LLC

Les patients LLC sont caractérisés par une lymphocytose supérieure à 5 G/L. Les cellules B-LLC présentent des marqueurs membranaires B classiques (CD19, CD20, CD22) [1, 19, 189] ainsi que le marqueur des cellules B matures folliculaires (CD23) [19, 26, 190]. Cependant, le CD22, régulant négativement le BCR [191], est faiblement exprimé. Les cellules B-LLC présentent également le CD5, normalement exprimé par les cellules T et la sous-population B1a péritonéale (cf I.1.2.2.1.). Le CD5 et le CD23 sont considérés comme des marqueurs de la LLC mais ne permettent pas de faire la différence entre les différents stades de la maladie [192].

L'hétérogénéité de la LLC et l'absence de traitement curateur ont conduit les communautés scientifiques et médicales à la recherche de marqueurs biologiques permettant de prédire l'évolutivité de cette maladie. A ce jour, le facteur pronostique de référence est le statut mutationnel des gènes codant pour les IgV<sub>H</sub> opéré lors des SHM [179, 180]. Il en résulte des changements aléatoires de l'affinité des anticorps pour les antigènes. Les patients comptant plus de 2% de

mutations somatiques sont dit mutés (M) et ont tendance à présenter une forme stable de la LLC tandis que les patients dits non mutés (UM) (< 2% de mutations somatiques) développent préférentiellement une forme évolutive de la LLC. Ce facteur reste le meilleur prédicateur de la survie des patients et suggère un rôle du BCR dans l'évolution de la maladie [193].

Les études transcriptomiques ont montré qu'il existe peu de différences entre les profils d'expression génique (GEP) retrouvés dans les cellules B-LLC ayant ou non des mutations somatiques. Néanmoins, ces études ont permis de mettre en évidence quatre gènes mutés de manière récurrente au sein des patients LLC. Les gènes MYD88 et KLHL6 sont mutés préférentiellement chez les patients M alors que des mutations sur les gènes NOTCH1 et XPO1 sont principalement retrouvées chez les patients UM. Ces changements oncogéniques contribueraient à l'évolution clinique de la maladie [194]. De plus, les patients UM présentent un pourcentage plus important de cellules exprimant le CD38 membranaire [179] et la protéine Zap70, dont la présence est considérée comme un facteur pronostique. En effet, cette tyrosine kinase, qui est normalement exprimée dans les cellules T et NK, l'est également dans les cellules B de certains patients. De plus, les cellules B positives pour Zap70 sont généralement des cellules de patients UM suggérant que la présence ectopique de Zap70 est liée à la forme agressive de la LLC [195, 196].

Le statut mutationnel des IgVH et l'expression ectopique de Zap70, qui sont les facteurs pronostiques les plus communément acceptés dans la LLC, contribuent à suggérer le rôle clé de la voie de signalisation du BCR dans la physiopathologie et la progression de cette hémopathie [197].

### **II.1.2. Accumulation d'un pool de cellules B-LLC**

La LLC est caractérisée par une accumulation de cellules B CD5<sup>+</sup> dans le sang, la moelle et les OLS, résultant d'un déséquilibre entre le processus de survie qui est augmenté et le processus d'apoptose qui est diminué. Les cellules B-LLC sont également soumises à une prolifération active.

#### **II.1.2.1. Balance survie / apoptose**

L'accumulation de B-LLC a longtemps été considérée comme la résultante d'un défaut d'apoptose. Suite à la rencontre avec l'antigène, ces cellules sur-expriment les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, survivin et Mcl-1 et sous-expriment les protéines pro-apoptotiques BAX et Bcl-XS [192, 198]. Ainsi, certaines cellules "répondeuses" à l'activation du BCR présentent une survie accrue en réduisant le taux d'apoptose spontanée [199]. Cependant, les cellules B-LLC qui ont

rencontré l'antigène et échappé à la sélection négative sont, pour la plupart, bloquées au stade G0/G1 [200]. En effet, les cellules "répondeuses" voient leur expression de cycline D2 et de cdk4 augmenter suite à une activation du BCR, leur permettant de progresser au stade G1 [199]. Cependant, les B-LLC sur-expriment la p27<sup>Kip1</sup>, un inhibiteur des cyclines, qui les empêche d'avancer plus loin dans le cycle cellulaire et les protège de l'apoptose. La sur-expression de la p27<sup>Kip1</sup> contribue, en partie, à la progression rapide la maladie [192, 201].

Si les cellules B-LLC circulantes semblent être dans un état de quiescence, un pool de cellules B-LLC retenu dans les ganglions est capable de proliférer. Une étude dans laquelle le temps de doublement lymphocytaire (LDT) a été mesuré *in vivo* a montré que les patients avec un LDT court sont associés à un risque élevé de développer une forme agressive de la LLC [202]. La surexpression du marqueur de prolifération Ki-67 dans les cellules B-LLC par rapport aux B normales *in vivo* confirme ces résultats, d'autant plus que les cellules B-LLC Ki-67<sup>high</sup> sont associées à un plus grand nombre de ganglions ainsi qu'à une survie plus courte des patients [203]. Une étude réalisée *in vitro* a conclu que la capacité de prolifération des cellules B-LLC, plus importante chez les patients UM que chez les patients M, est un facteur important de prédiction de la progression de la maladie ainsi que de la survie du patient [193].

### II.1.2.2. Rôle du microenvironnement

Contrairement aux résultats observés *in vivo*, les cellules B-LLC meurent rapidement *in vitro*, suggérant un rôle du microenvironnement dans leur survie chez les patients. Si le BCR permet de réguler l'homéostasie des cellules B-LLC, d'autres récepteurs tels que les récepteurs aux chimiokines ou les intégrines participent également à la survie et à la prolifération de ces cellules. Les cellules B-LLC interagissent avec des cellules stromales ainsi que des cellules T qui jouent un rôle clé dans la progression de la LLC. C'est en effet dans la moelle et les ganglions que les cellules B-LLC se protègent au mieux contre l'apoptose et que certaines puisent des capacités prolifératives [192] dans des centres de prolifération, appelés pseudofollicules.

#### *Moelle osseuse*

Les cellules stromales de la moelle (BMSC) ont été les premières décrites pour protéger les cellules B-LLC contre l'apoptose spontanée *in vitro* [204]. Les BMSC sécrètent du CXCL12 et expriment VCAM-1 qui permettent l'adhérence puis la migration des B-LLC sous une monocouche

de BMSC par un processus de pseudoempériplèse. Ces 2 processus sont dépendants des taux d'expression du CXCR4 et de VLA-4 qui sont liés dans les B-LLC, suggérant une coordination de ces molécules dans le trafic des B-LLC vers les tissus lymphoïdes. Les B-LLC localisées dans le compartiment médullaire sur-expriment le CXCR4 à leur surface et l'axe CXCR4-CXCL12 est également impliqué dans la polymérisation d'actine et la survie des B-LLC [205].

Par ailleurs, les cellules B-LLC sécrètent du CCL3 et du CCL4 en réponse à une stimulation du BCR. Ces chimiokines sont normalement exprimées lors de la réponse immunitaire et recrutent les cellules T et les monocytes. Des niveaux plasmatiques élevés de CCL3 et CCL4 ont été retrouvés chez les patients LLC ayant des facteurs de mauvais pronostic (UM, ZAP70+, CD38+) [206, 207].

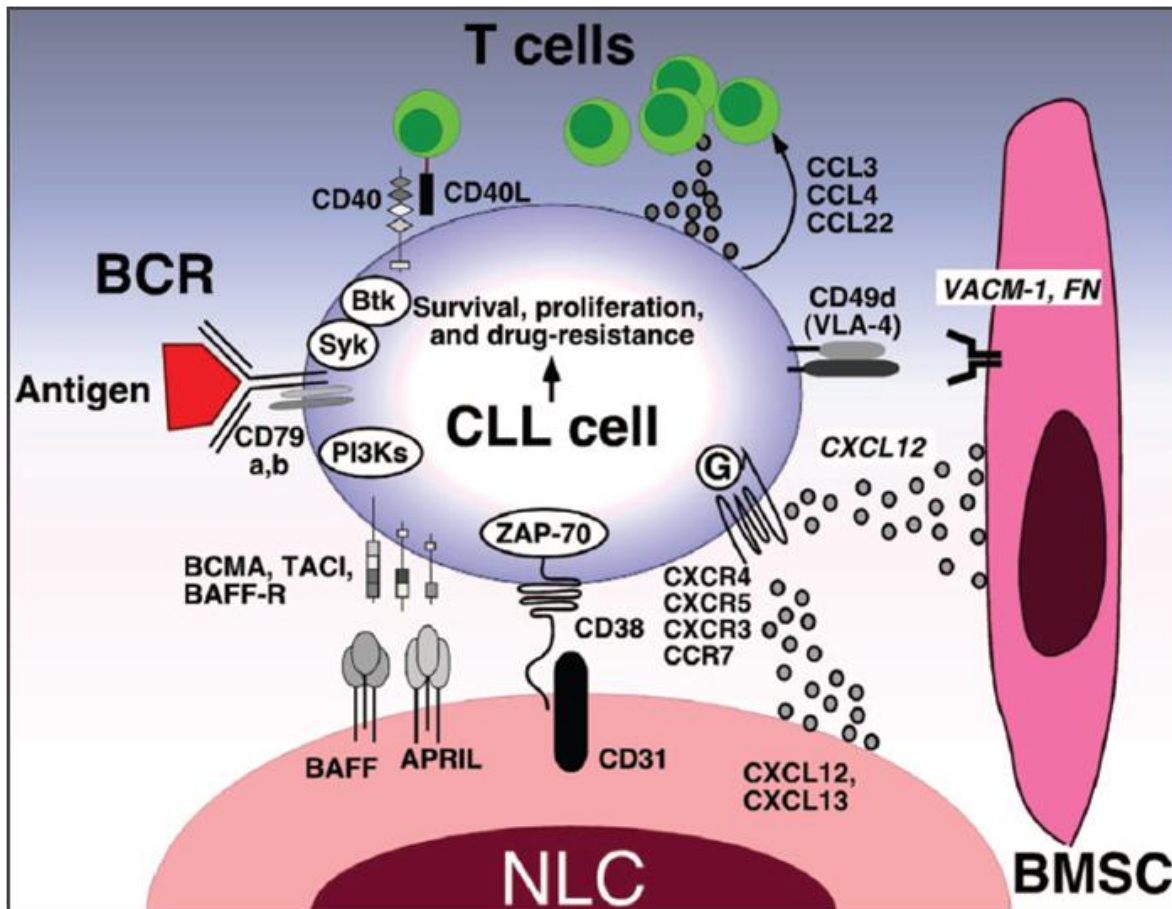
Les cellules T CD4+ activées et CD8+ prolifératives sont plus nombreuses dans les pseudofollicules des patients LLC avec un ratio en faveur des CD4+. Elles présentent un GEP différent des cellules T saines et un phénotype déficient quant à leur cytotoxicité et à la polymérisation d'actine impliquée dans la formation de la synapse immunologique [208, 209]. Malgré de nombreuses controverses, les CD4+ activées favorisent la prolifération des cellules B-LLC. En effet, le recrutement des cellules T CD3+/CD4+/CD40L+ par les B-LLC stimule les voies de signalisation du CD40 et du BCR des cellules de B-LLC qui agissent en synergie pour induire de hauts niveaux d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Mcl-1 [178, 205].

Les monocytes sécrètent du CXCL12 et du CXCL13 et expriment le CD31 (ligand du CD38) ainsi que BAFF et APRIL (prolifération-inducing ligand). Ces deux derniers ligands reconnaissent les récepteurs TNF (tumor necrosis factor) exprimés par les cellules B, tels que BCMA (B cell maturation antigen) ou BAFF-R, et induisent également l'expression de protéines anti-apoptotiques ainsi que des signaux de survie et de prolifération [205]. L'axe CXCR5-CXCL13 entraîne une polymérisation d'actine, l'endocytose du CXCR5 et la migration des B-LLC dans les follicules lymphoïdes propices à la prolifération [205]. Le CD31 lie le CD38 et active les voies de signalisation impliquant Zap70 et ERK 1/2 pour augmenter la prolifération et la migration des cellules B-LLC [210]. L'interaction entre le CD38 et ZAP70 pourrait également renforcer la signalisation du BCR [211] (*Figure 26*).

### **Organes lymphoïdes secondaires**

Dans les autres organes lymphoïdes, le couple cellulaire formé entre les BMSC et les monocytes est remplacé par celui constitué par les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et

les cellules nurse-like (NLC). Si les interactions des B-LLC avec les cellules du microenvironnement ganglionnaire semblent être calquées sur celles du microenvironnement médullaire, ces microenvironnements sont différents sur le plan fonctionnel en favorisant respectivement la différenciation et la maturation des lymphocytes B [205].



**Figure 26. Interactions moléculaires mises en jeu entre le microenvironnement et les cellules B-LLC (Burger et al., 2011) [205].** Les contacts entre les cellules B-LLC et les cellules stromales de la moelle (BMSC) ou les cellules nurse-like (NLC) s'établissent principalement grâce à des récepteurs aux chimiokines et des molécules d'adhérence. Les NLC sécrètent les chimiokines CXCL12 et CXCL13 alors que les BMSC expriment essentiellement CXCL12. Ces deux chimiokines attirent les cellules B-LLC qui possèdent à leur surface les récepteurs couplés aux protéines G appropriés, le CXCR4 et le CXCR5. Les intégrines, dont VLA-4, exprimées par les B-LLC interagissent avec leurs ligands (VCAM-1 et fibronectine) exprimés par les cellules stromales. Les NLC, quant à elles, expriment les membres de la famille TNF (BAFF et APRIL) qui se lient à leurs récepteurs exprimés par les B-LLC. L'expression du CD38 par les B-LLC permet l'interaction avec le CD31 qui est présent à la surface des NLC et les cellules stromales. La stimulation du BCR et la co-culture avec des NLC induisent la sécrétion de CCL3 et CCL4 par les B-LLC qui permettent le recrutement de cellules T. L'interaction entre les cellules B et T est maintenue par l'interaction entre le CD40 présent à la surface des cellules B-LLC et son ligand.

En effet, les cellules B-LLC cultivées en présence de BMSC ont montré des GEP où sont régulés de façon positive des proto-oncogènes lymphoïdes tels que *TCL1* [212]. En revanche, les NLC induisent des profils où les gènes induits par la signalisation du BCR tels que *CCL3*, *CCL4* ou *MYC* sont positivement régulés [207]. La comparaison des GEP entre les cellules B-LLC issues de différents tissus lymphoïdes (sang, moelle et ganglions) a montré que les cellules situées dans les ganglions présentent des profils similaires aux cellules cultivées avec les NLC, avec une régulation positive des gènes impliqués dans les voies de signalisation du BCR et de NF- $\kappa$ B. Ces résultats montrent ainsi que les ganglions sont les sites favorables à l'activation et à la prolifération des cellules tumorales [213]. La sur-expression de ces gènes est d'autant plus élevée que les patients sont progressifs, suggérant une signalisation du BCR plus efficace dans les cellules de ces patients *in vivo*. Les cellules B-LLC s'accumulent alors dans ces mêmes compartiments par un processus dépendant en partie du CXCR4 et de la L-sélectine CD62L. En effet, dans un contexte normal, le CXCR4 permet aux cellules B d'entrer dans les ganglions puis d'en ressortir en passant à travers les cellules endothéliales lymphatiques. Dans le contexte de la LLC, une stimulation antigénique soutenue *in vitro* entraîne internalisation du CXCR4 ainsi qu'un clivage enzymatique du CD62L préférentiellement dans les cellules B de patients progressifs, diminuant ainsi la migration vers le CXCL12 et l'adhérence aux cellules endothéliales lymphatiques [214]. De plus, les patients progressifs possèdent un pool de cellules B prolifératives Ki-67<sup>+</sup> qui montrent également un taux d'expression de CXCR4 à la surface plus faible que les cellules non prolifératives [208]. Ces données expliqueraient l'accumulation d'un pool de cellules B-LLC prolifératives dans les ganglions [214].

Par ailleurs, le S1PR1 exprimé à la surface des cellules B normales dans le ganglion permet aux cellules de rejoindre les sinus lymphatiques et de sortir du ganglion. De la même manière que pour le CXCR4, une stimulation antigénique soutenue *in vitro* entraîne une diminution de l'expression membranaire de S1PR1 par les cellules B-LLC qui sont alors retenues dans les ganglions. Cette diminution est plus importante dans les cellules B prolifératives que dans les cellules quiescentes [215].

Le traitement des cellules B-LLC par un inhibiteur de Syk, le R406, entraîne une augmentation du CXCR4 [216] et du S1PR1 [215], décrivant un rôle de cette kinase dans la rétention des cellules B leucémiques dans les ganglions [217].

## **II.2. Signalisation du BCR et progression de la maladie**

Les analyses moléculaires et fonctionnelles du BCR dans les cellules B-LLC suggèrent fortement qu'une stimulation antigénique est impliquée dans la sélection clonale et la prolifération des clones tumoraux [197].

### **II.2.1. Dérégulation du BCR**

La dérégulation de l'homéostasie des cellules B-LLC résulte en partie d'un défaut de synthèse et d'expression du BCR qui se traduit par la présence de voies d'activation altérées en réponse à l'antigène.

#### **II.2.1.1. Synthèse et expression**

##### ***II.2.1.1.1. Isotypes***

Les cellules B-LLC expriment à leur surface des IgM ou un mélange d'IgM et d'IgD ; les deux isotypes partageant les mêmes déterminants idiotypiques [218]. Contrairement aux cellules B normales qui expriment l'AID en réponse à une stimulation du CD40 par les cellules T, un petit pool de cellules B-LLC UM possède un fort taux d'AID entraînant une CSR. Ces cellules, associées à la forme agressive de la maladie, sont donc IgG<sup>+</sup> ou IgM<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>. De plus, les cellules IgG<sup>+</sup> expriment également plus de protéines de survie et de prolifération associées à la progression de la maladie (Ki-67, c-myc, Bcl-2 et VLA-4) et moins de p27<sup>kip1</sup> que les IgM<sup>+</sup> [192]. Contrairement aux IgM, la signalisation en aval des IgD est plus transitoire et échoue à induire la survie ou la prolifération. Les IgD ne semblent donc pas influencer l'évolutivité de la LLC [219, 220].

##### ***II.2.1.1.2. Niveau d'expression***

Les cellules B-LLC présentent un plus faible taux d'expression d'IgD et d'IgM ainsi que d'Igβ à leur membrane plasmique par rapport aux cellules B normales [192, 220]. Ce faible niveau viendrait du contact continu avec divers antigènes qui entraîneraient une internalisation des IgM *in vivo*. En revanche, les cellules B-LLC isolées et mises en culture ré-expriment à leur surface des IgM [219, 220]. Parmi ces cellules, les UM expriment plus d'IgM que les M. Ce différentiel est expliqué en partie par la présence de mutations des gènes codant pour les chaînes Igβ des cellules M uniquement ou encore par un défaut de glycosylation qui retient les IgM dans le RE (voir



paragraphe suivant). Les cellules IgD<sup>+</sup>, quant à elles, ont une expression stable de leur BCR *in vivo* dont le taux n'est pas augmenté *in vitro* [220].

### ***II.2.1.1.3. Synthèse altérée***

#### ***Défaut de glycosylation des chaînes $\mu$ et Ig $\alpha$***

Alors que les cellules B normales n'expriment qu'une forme mature des IgM de surface, à savoir complètement glycosylée, les B-LLC possèdent deux formes avec une forme mature, similaire à la forme normale, et une forme immature [221]. Après des processus de transcription et de traduction normaux, la forme immature est soumise à un processus de glycosylation altéré des chaînes  $\mu$  et Ig $\alpha$  qui interfère avec le correct assemblage du BCR et entraîne une rétention dans le RE [222]. Cependant, un petit pourcentage d'IgM immatures est exporté à la surface des B-LLC avec un taux d'expression de la forme immature plus important dans les B-LLC UM comparé à celui des M [192]. Considérant que la forme mature est internalisée en réponse à une stimulation antigénique et l'est d'autant plus dans les cellules M que UM, restent les BCR immatures qui pourraient être associés au signal tonique de survie. La forme immature est donc décrite pour être associée à la forme progressive de la maladie [219, 221].

#### ***Epissage alternatif des chaînes Ig $\beta$***

Les chaînes Ig $\beta$  ne sont pas détectables à la surface des cellules B chez 75% des patients LLC alors qu'elles le sont dans plus de 80% des cellules B normales. Cette absence de détection est expliquée par la présence d'une isoforme tronquée des chaînes Ig $\beta$ , née d'un épissage alternatif et dans laquelle l'exon 3, qui code pour le domaine extracellulaire Ig-like, est absent. Les Ig $\beta$  étant essentiels au transport des Ig à la membrane, à la transduction du signal et au processus apoptotique, leur absence dans les cellules B-LLC serait liée à la faible expression d'IgM de surface qui jouerait un rôle dans la physiopathologie de la LLC [223]. Cette isoforme tronquée viendrait de mutations dans la région codante des Ig $\beta$  observées dans 65% des patients LLC et ces mutations résulteraient des SHM ayant lieu dans les CG. Les isoformes mutées, qui concernent les patients M, contribueraient à une réponse moins efficace de leurs cellules B-LLC [224].

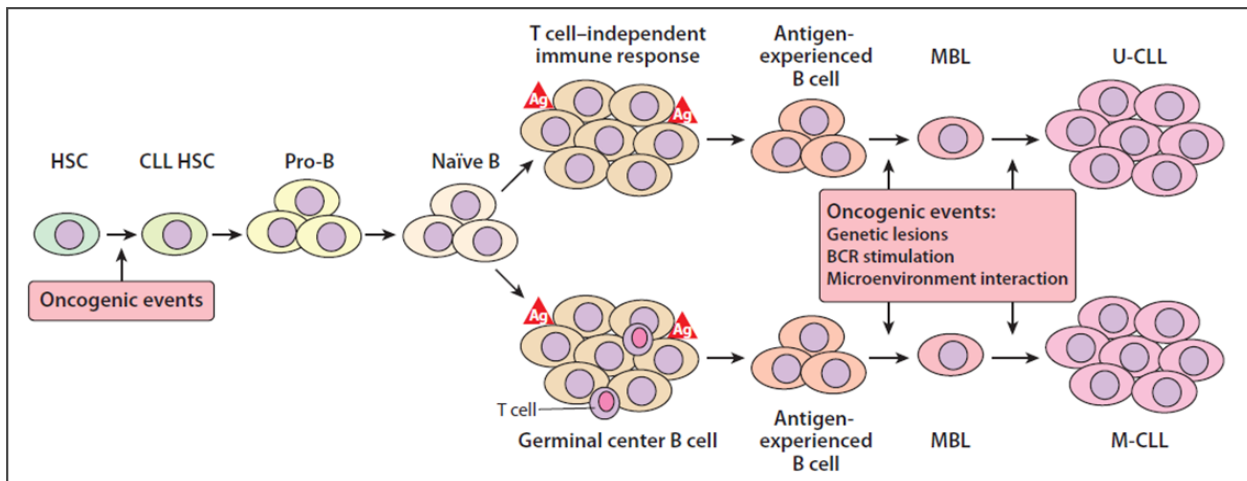
### **II.2.1.3. Répertoire biaisé**

Le panel de réponses cellulaires différentielles des cellules B-LLC résulte d'une capacité de réponse au BCR différentielle entre des cellules capables de déclencher une signalisation efficace

menant à leur survie et à leur prolifération et d'autres cellules non réactives, dites anergiques. Ainsi, la stimulation antigénique permet de distinguer deux groupes de patients dont un est caractérisé par des cellules B dites « répondeuses » et l'autre par des cellules « non répondeuses ».

### II.2.1.3.1. Statut mutationnel des IgVH

Le modèle actuel de développement des cellules B-LLC M et UM propose une série d'évènements oncogéniques communs au stade HSC. Ce n'est qu'après présentation de l'antigène par les cellules T dans les centres germinatifs et suite à des SHM, que les cellules B CD5<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> sont à l'origine des cellules B-LLC M. Si la rencontre de l'antigène se passe hors des centres germinatifs et indépendamment des cellules T, les cellules B CD5<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> aboutissent à la formation des cellules B-LLC UM [211] (Figure 27).



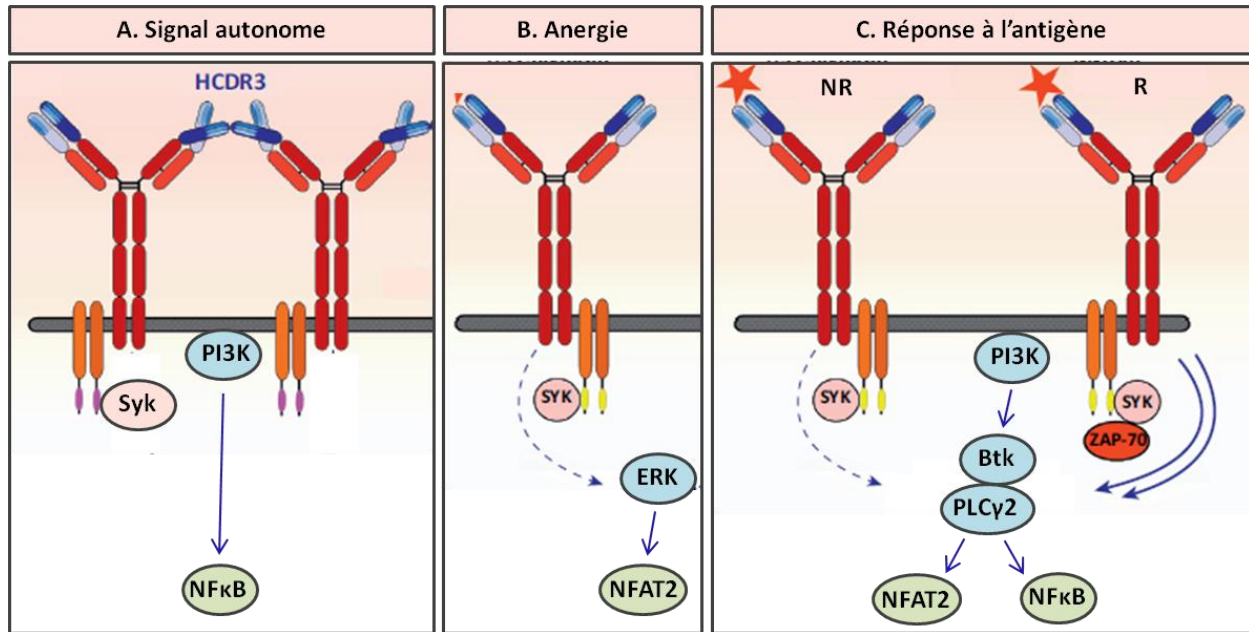
**Figure 27. Modèle développemental des cellules B-LLC (Zhang et al., 2014) [211].** Des mutations contribuant au développement de la LLC peuvent survenir à tous les stades du développement B, y compris au stade HSC. Les HSC, porteuses d'évènements oncogéniques, donneraient des avantages de survie et/ou de croissance qui conduiraient les cellules B stimulées par l'antigène (Ag) à **1**) rejoindre les centres germinatifs où en présence des cellules T, elles progresseraient en MBL (monoclonal B cell lymphocytosis) pour donner naissance à un clone leucémique exprimant un BCR muté (M-CLL) ou **2**) en dehors des centres germinatifs et indépendamment des cellules T, elles progresseraient en MBL pour aboutir à la formation d'un clone de cellules B de LLC dont le BCR est non-muté (U-CLL). La progression au stade LLC est associée à une accumulation de lésions génétiques de novo et dépendante de la stimulation du BCR et des interactions avec le microenvironnement.

En effet, les BCR des patients UM étant poly-réactifs, ils peuvent reconnaître des auto-antigènes ainsi que des antigènes environnementaux ou microbiens [208]. Leur BCR ont donc une plus faible affinité pour l'antigène que les BCR des cellules B-LLC M, qui elles renforcent la spécificité de leur BCR pour l'antigène dans les centres germinatifs [219].

### ***II.2.1.3.2. Activation indépendante de l'antigène***

A ce jour, deux mécanismes d'activation des voies de signalisation en aval du BCR existent dans les cellules leucémiques : l'un est dépendant d'un antigène ou d'un ligand et l'autre, indépendant de l'antigène, conduit à un signal tonique ou autonome [208]. D'une part, des BCR quasi-identiques sont exprimés chez plus de 30% des patients LLC, préférentiellement les UM. En associant des segments  $V_H$  avec des  $IgD_H-J_H$  spécifiques et des  $IgV_L$  avec des  $IgJ_L$  spécifiques qui conduisent à des régions CDR3 des chaînes lourdes (HCDR3) remarquablement similaires, leur BCR "stéréotypées" [225, 226] permettraient la reconnaissance d'un antigène spécifique qui favoriserait la sélection et la prolifération du clone LLC. D'autre part, différents motifs peptidiques lient les cellules B-LLC *via* la région HCDR3 et l'un de ces motifs, présentant une homologie avec la région FR2 des chaînes lourdes, est capable d'interagir avec la région HCDR3 stéréotypée. Le transfert de cette région HCDR3 sur un BCR « non autonome » conduit à un signal autonome alors que la mutation du motif intrinsèque FR2 du BCR entraîne la perte du signal tonique. Pour une interaction efficace qui aboutit à un signal tonique, la reconnaissance entre le motif FR2 d'un BCR se fait très probablement avec la région HCDR3 d'un BCR adjacent sur une même cellule leucémique.

Ce signal est permis grâce à un déséquilibre entre les régulateurs positifs et négatifs qui se traduit par une activation partielle de Syk, avec une phosphorylation sur les résidus tyrosines 525 et 526 indétectable, conduisant à une mobilisation calcique transitoire et à l'induction de gènes cibles de NF- $\kappa$ B, tels que *MYC*, impliqués dans la survie cellulaire [226, 227] (*Figure 28.A*). Les cellules B-LLC pourraient donc être sélectionnées positivement par les capacités de leur région HCDR3 à reconnaître des épitopes intrinsèques. Ces résultats n'excluent pas l'implication d'une stimulation par un antigène extrinsèque dans la physiopathologie de la LLC [227]. En effet, ce signal tonique permettrait aux cellules B-LLC UM de survivre plus longtemps et de diminuer leur seuil d'activation en attendant que la liaison d'un antigène extrinsèque "typique" déclenche une signalisation plus forte et induise la prolifération des cellules B-LLC [225, 226].



**Figure 28. Mécanismes d'activation du BCR dans les cellules B-LLC (adapté de Burger et Chiorazzi, 2013) [10].** A) Les cellules B-LLC, qui sont pourvues d'un BCR "stéréotypé", reconnaissent un épitope intrinsèque et, indépendamment d'un antigène extrinsèque, activent la voie NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire de la PI3K. Le signal transmis est dit autonome. B) L'activation constitutive de la voie ERK/NFAT2 dans certaines cellules B-LLC permet leur survie mais les rendent insensibles à une stimulation antigénique. Ces cellules sont dites anergiques. C) Les cellules B de LLC, qui sont capables de répondre à une stimulation antigénique, déclenchent les voies NFAT2 et NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire des protéines PI3K, Btk et PLC $\gamma$ 2 pour leur survie et leur prolifération.

### II.2.1.3.2. Anergie

Suite à une stimulation des B-LLC par un antigène, leur réponse prédominante est l'anergie, qui est un processus par lequel les cellules B-LLC auto-réactives sont rendues tolérantes en absence de cellules T helper CD4+ [220]. Ces cellules sont caractérisées par l'expression faible d'IgM de surface et constitutivement activées pour ERK 1/2 et NFAT2 qui les rendent « insensibles » à une stimulation antigénique *in vitro* en terme de réponse calcique [197] (Figure 28.B). Si l'anergie peut être observée dans toutes les cellules B-LLC, elle est plus fréquente dans les cellules M [220] et plutôt associée à la forme indolente de la maladie. En effet, les cellules UM poly-réactives répondent fréquemment à l'antigène en déclenchant des voies de signalisation menant à la survie et à la prolifération [219]. Les cellules anergiques survivent par l'intermédiaire de BAFF mais prolifèrent peu en réponse à d'autres stimuli [193, 220]. L'anergie, qui viendrait d'une stimulation constitutive du BCR *in vivo*, peut être reversée *in vitro* en cultivant les cellules suffisamment longtemps pour

libérer le BCR ou en inhibant l'activité de ERK ou de NFAT2 qui conduit à l'apoptose. Ainsi, l'anergie jouant un rôle important dans la survie et la croissance des cellules B-LLC pourrait être la cible d'agents thérapeutiques [197].

#### **II.2.1.3.4. Statut de réponse à l'antigène**

La stimulation antigénique *in vitro* permet de distinguer deux groupes de patients LLC. Un premier groupe de patients, dit "non répondeur" (NR), dont les cellules B présentent des cellules anergiques et un second groupe, dit répondeur (R), dont les cellules montrent une phosphorylation importante de Syk et une prolifération cellulaire associées à un mauvais pronostic [228] (*Figure 28.C*). Des travaux ultérieurs montrent qu'une stimulation antigénique, lorsqu'elle est soutenue, conduit à une résistance à l'apoptose spontanée et à une augmentation de l'activité métabolique des cellules des patients R. Cet avantage de survie est associé à une augmentation de l'expression de la cycline D2 et de la cdk4 (cyclin dépendant kinase 4) qui permet aux cellules B-LLC quiescentes de progresser en phase G1 du cycle cellulaire. L'expression de l'inhibiteur des cyclines p27<sup>KIP1</sup>, qui est élevée dans les cellules B des deux groupes, expliquerait la faible progression du cycle cellulaire dans les phases suivantes [199]. Ces résultats corroborent une autre étude montrant qu'une partie des patients R présente des B-LLC prolifératives Ki-67<sup>+</sup> [229]. De plus, l'étude du lien entre la réponse à l'antigène *in vitro* des cellules B leucémiques et les facteurs pronostiques (statuts mutationnels des IgVH, Zap70, LDT et TK) des patients suggère que la réponse antigénique mesurée *in vitro* est impliquée dans la progression de la LLC [199].

### **II.2.2. Signalosome autour de Syk**

Jusqu'à présent, aucune mutation des gènes codant pour les différents effecteurs de la voie d'activation du BCR n'a été identifiée dans les cellules B-LLC [208]. En revanche, une comparaison des GEP entre les cellules B-LLC et normales stimulées par un antigène a identifié Syk et des molécules en aval de signalisation du BCR comme étant surexprimées dans les B-LLC [230].

#### **II.2.2.1. Syk**

##### ***Syk dans la LLC***

Le gène de Syk est régulé positivement dans les cellules B-LLC [230] et par conséquent, le niveau d'ARNm de Syk ainsi que l'expression protéique sont plus élevés dans les cellules B-LLC par

rapport aux cellules B normales, est d'autant plus élevés dans les cellules UM que dans les cellules M [231]. Dans ce contexte, la phosphorylation basale de Syk apparaît plus importante dans les cellules B-LLC (*Figure 29*) et d'avantage dans les cellules UM [231]. La tyrosine 352 de Syk est constitutivement phosphorylée par Lyn et contribue à l'activation basale de Syk capable d'induire la survie des cellules B-LLC dans le signal tonique [232, 233]. Cette phosphorylation est renforcée par une autre SFK, Lck, suite à une stimulation antigénique [234]. Les tyrosines 525 et 526 sont alors phosphorylées et semblent nécessaires à l'augmentation de la phosphorylation basale des effecteurs en aval de Syk et dans le maintien du signal afin d'induire la prolifération des cellules [232, 233]. Syk est également impliquée dans les voies de signalisation en aval des récepteurs aux chimiokines et aux intégrines conduisant à la migration des B-LLC vers le CXCL12 [231].

Cependant, aucune mutation somatique ou SNP (single nucleotide polymorphism) pouvant expliquer un gain de fonction n'a été détecté dans le domaine kinase [235] ou dans la séquence entière de Syk dans les cellules B-LLC. En effet, les 18 SNP identifiés ne sont pas spécifiques des B-LLC et codent pour le même codon aboutissant à une séquence protéique sauvage [236]. Les mécanismes responsables de l'activité et de la stabilité de Syk dans les cellules B-LLC restent inconnus [237].

### *Syk dans les autres pathologies*

Syk est impliquée dans d'autres pathologies hématopoïétiques, généralement à cause d'une activité aberrante. Elle est notamment constitutivement phosphorylée lors de la prolifération de lymphomes comme les lymphomes à petites cellules (SCL), folliculaire (FCL) ou de Burkitt (BL) [238]. Une translocation génétique menant à une protéine de fusion TEL - Syk, où le domaine kinase de Syk est associé au domaine de dimérisation de TEL, conduit également à une phosphorylation constitutive de Syk dans les syndromes myélodysplasiques à l'origine de leucémies myéloïdes aiguës [239]. TEL-Syk joue un rôle dans la prolifération cellulaire en activant les voies ERK et Akt [233, 240] mais n'a pas d'activité transformante *in vitro* [241]. A l'inverse, une autre translocation qui mène à une protéine de fusion Itk-Syk (association du domaine kinase de Syk au domaine TH-PH d'Itk), possède une activité transformante *in vitro*. Itk-Syk est constitutivement phosphorylée sur les tyrosines de l'interdomaine et conduit au développement de lymphomes T [242, 243]. Toutefois, la leucémie aigue lymphoblastique de l'enfant touchant des précurseurs B bloqués au stade pro-B est marquée par une diminution significative de l'expression de Syk [244].

Par ailleurs, Syk est exprimée dans le tissu mammaire humain sain, des lésions mammaires bénignes ou encore dans les lignées cellulaires de cancer du sein à faible potentiel tumorigène. Cependant, l'ARNm de Syk est faible, voire indétectable, dans les tissus et les lignées cellulaires mammaires à caractère invasif. Cette sous-expression est fortement associée à une hyperméthylation du promoteur du gène *SYK*. La transfection de Syk dans une lignée cellulaire du sein à fort potentiel tumorigène et métastatique est suffisante pour supprimer la croissance tumorale et la formation de métastases. L'isoforme courte, SykB, à qui il manque un signal de localisation nucléaire, n'est quant à elle, pas exprimée dans les tissus mammaires sains et sa réexpression dans des cellules épithéliales au potentiel métastatique n'inhibe pas leur caractère invasif [70].

## **II.2.2.2. Partenaires de Syk**

### **II.2.2.2.1. SFKs**

Comme dans les cellules B normales, Lyn est la SFK majoritaire exprimée dans les cellules B-LLC. Malgré des niveaux d'expression d'ARNm similaires entre les cellules B normales et les cellules B-LLC, Lyn est surexprimée et constitutivement activée dans les cellules B leucémiques (*Figure 29*) [245, 246]. Normalement localisée dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, Lyn est en partie retrouvée dans le cytosol des cellules B-LLC. Cette localisation aberrante serait attribuée à un défaut de myristoylation/palmitoylation ou à un excès de Lyn à la membrane qui se traduit par sa présence plus importante dans le cytosol [245]. Les études de son implication fonctionnelle dans les cellules B-LLC montrent que Lyn phosphoryle constitutivement le CD5, un co-récepteur négatif du BCR, et la phosphatase Shp-1, permettant le recrutement de Shp-1 *via* ses domaines SH2 sur les tyrosines phosphorylées du motif ITIM du CD5. Elle contribue ainsi au signal tonique responsable de la résistance à l'apoptose des B-LLC non stimulées [246].

Lck, une autre protéine de la famille des SFKs, est normalement exprimée dans les cellules T et pas dans les cellules B. Comme Zap70, elle est également surexprimée dans les B-LLC [247]. Contrairement à Lyn, dont le niveau d'expression est similaire dans toutes les cellules B-LLC, le taux d'expression de Lck varie dans les cellules B d'un patient à un autre. De plus, l'inhibition spécifique de Lck supprime les capacités du BCR à induire des signaux de survie dans les B-LLC en réponse à une stimulation antigénique. Si Lck phosphoryle Zap70 dans les cellules T, aucune association entre l'expression de Lck et celle de Zap70 dans les cellules B-LLC, n'a été établie [234].

#### II.2.2.2.2. Régulateurs positifs

**Zap70.** L'autre membre de la famille Syk, la protéine Zap70, est exprimée de façon ectopique dans les cellules B-LLC de certains patients, et préférentiellement dans les cellules UM. En s'associant directement aux complexes autour du BCR, Zap70 est phosphorylée [248] et participe à la signalisation du BCR en réponse à une stimulation antigénique [249]. Cependant, la phosphorylation de Zap70 ne concerne pas les résidus tyrosines 319 (équivalent Y352 de Syk) et 494 (équivalent Y526 de Syk) impliqués dans son activation mais intéressent les tyrosines 292 et 474 qui sont importantes dans son interaction avec les PI3K ou Cbl [250]. Indépendante de son activité kinase, l'augmentation de la signalisation du BCR en présence de Zap70 s'est révélée être dépendante de son domaine SH2 suggérant un rôle d'adaptateur [251]. L'expression de Zap70 n'est ni nécessaire, ni suffisante pour induire la survie et la prolifération des cellules B-LLC [199] et son expression n'est associée à la forme progressive de la LLC que lorsque le ratio Zap70/Syk est supérieur à 0.25 [252]. A ce jour, le rôle de Zap70 dans les cellules B-LLC reste indéterminé [226].

**Btk.** Le niveau d'expression transcriptionnelle de *BTK* est homogène entre les différents échantillons et significativement plus élevé dans les cellules B-LLC comparé aux cellules normales. En revanche, l'expression protéique de Btk est variable d'un patient à l'autre et la protéine est constitutivement phosphorylée et activée dans les cellules de certains patients seulement (*Figure 29*) [253]. En réponse à une stimulation du BCR ou du CD40, Btk activée permet la phosphorylation de ERK 1/2, Akt ou encore NF- $\kappa$ B qui contrôlent la survie et la prolifération des B-LLC [253, 254]. Elle participe également à la migration des cellules B-LLC en réponse aux chimiokines CXCL12 et CXCL13 et au recrutement des cellules accessoires en régulant positivement les sécrétions de CCL3 et CCL4 induites par le BCR *in vitro* et *in vivo* [255].

Comme décrit précédemment, l'expression de Btk est requise au développement normal des cellules B. Pour mieux définir son implication dans le développement de la LLC, le modèle de LLC murin IgH.ET $\mu$  a été utilisé en modulant l'expression de Btk. Si les souris IgH.ET $\mu$  présentent une diminution de leur survie liée au développement tumoral, les souris IgH.ET $\mu$  déficientes en Btk ne développent pas de LLC et leur survie n'est donc pas affectée. En revanche, une surexpression de Btk modifie la sélection clonale des BCR et accélère la formation tumorale ainsi que la mortalité des souris. L'expression et le niveau d'expression de Btk sont donc déterminants dans le développement et la progression de la LLC [256].



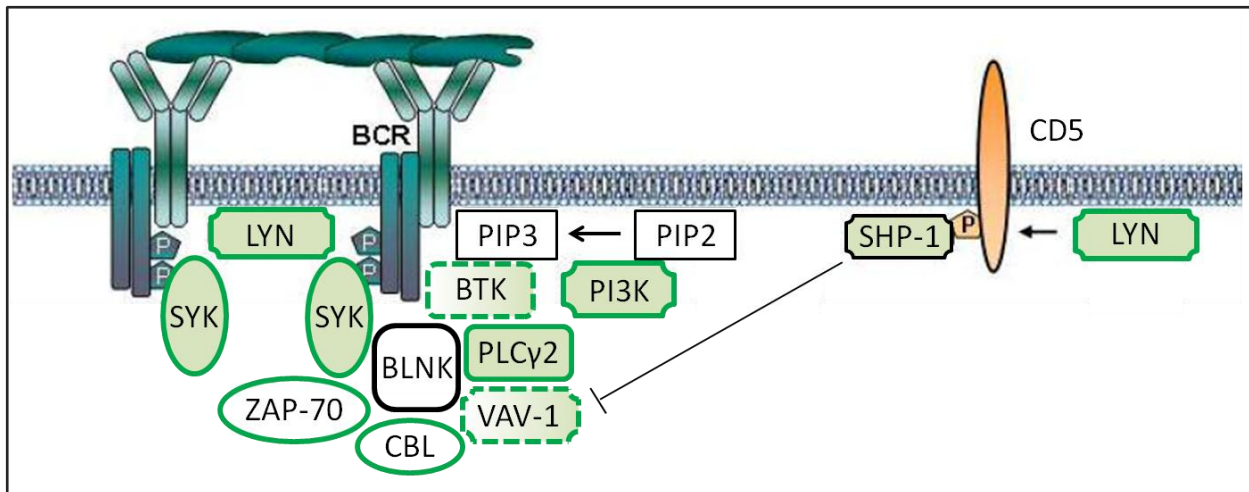
**PLC $\gamma$ 2.** L'expression basale de la protéine PLC $\gamma$ 2 est significativement augmentée dans les cellules B-LLC comparée aux cellules saines. Sa phosphorylation basale apparaît également plus importante dans les cellules B-LLC (*Figure 29*) [257]. En revanche, après engagement du BCR, si la PLC $\gamma$ 2 est phosphorylée dans presque toutes les cellules saines, sa phosphorylation dans les cellules B-LLC est beaucoup plus hétérogène [258]. Phospho-PLC $\gamma$ 2 est un facteur prédictif de la réponse du patient au Dasatinib, un inhibiteur spécifique de l'activité des SFK utilisé en clinique. En effet, le pourcentage de diminution de la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 dans les cellules traitées avec le Dasatinib est corrélé à la mortalité cellulaire [259]. Il est intéressant de noter qu'un traitement prolongé des patients LLC avec un inhibiteur spécifique de Btk, l'Ibrutinib, entraîne l'apparition de mutations dans la séquence de PLC $\gamma$ 2 (R665W, L845F et S707Y) qui se traduisent par un gain de fonction. En effet, la mutation S707Y perturbe le domaine SH2 auto-inhibiteur et les deux autres mutations entraînent une augmentation du flux calcique suite à une stimulation du BCR malgré l'inhibition de Btk. Cette réponse est donc indépendante de Btk et contribue à l'activation autonome du BCR [260].

**Vav.** Le niveau d'expression de Vav dans les cellules B-LLC a été associé aux anomalies génétiques récurrentes chez les patients LLC. En effet, la protéine Vav est surexprimée et hyperphosphorylée dans un tiers des cas de la LLC et plus particulièrement chez les patients présentant une délétion 13q [261]. D'autre part, Vav-1 est également impliquée dans la polymérisation d'actine et la survie cellulaire induites par les intégrines et significativement plus phosphorylée dans les cellules CD38<sup>+</sup> où l'interaction du CD38 avec VCAM-1 renforce la viabilité des cellules B-LLC [262].

**PI3K- $\delta$ .** La PI3K- $\delta$  est la principale isoforme de la signalisation dans les cellules B normales et de LLC [263]. Alors qu'elle est activée en réponse à une stimulation du BCR ou du CD40 dans les cellules B normales, elle est surexprimée [264] et constitutivement activée dans les B-LLC (*Figure 29*) [265]. Un blocage de l'activité PI3K, par l'inhibiteur pan-PI3K LY294002, provoque une régulation négative des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1. L'inhibition spécifique de PI3K- $\delta$  avec l'Idelalisib réduit significativement la phosphorylation d'Akt à un niveau proche de celui retrouvé dans les B normales [263] et induit l'apoptose des cellules B-LLC non stimulées [264, 265]. La PI3K- $\delta$  est donc impliquée dans le signal tonique maintenant la survie des B-LLC [265, 266]. L'activation des PI3K est renforcée en réponse à une stimulation antigénique soutenue [267] ou à l'activation des récepteurs aux chimiokines ou des intégrines et mène à la survie, la prolifération et la migration cellulaire [208]. L'Idelalisib réduit également les niveaux sériques de chimiokines

associées à la LLC telles que CCL3, CCL4 et CXCL13 [208, 263]. Une autre isoforme est impliquée dans la polymérisation d'actine et le chimiotactisme vers le CXCL12, la PI3K $\alpha$ . Son inhibition spécifique réduit la migration cellulaire ainsi que la phosphorylation d'Akt induisant l'apoptose [268].

**BLNK.** En dehors de la phosphorylation de BLNK qui est significativement augmentée en réponse à une stimulation antigénique dans les cellules B-LLC exprimant Zap70 [249], peu d'informations sont publiées quant à son expression transcriptionnelle ou traductionnelle.



**Figure 29. Modèle du signalosome mis en jeu dans les cellules B-LLC en réponse à l'engagement du BCR (adapté de Efremov et al., 2012) [269].** La reconnaissance d'un antigène par le BCR membranaire déclenche la transmission d'un signal initié par Lyn et Syk. Cette dernière phosphoryle différents effecteurs dont l'expression et l'activation peuvent être altérées dans les cellules B-LLC. Les cadres verts indiquent une surexpression protéique (trait plein) dans les cellules B de tous les patients LLC, dans les cellules leucémiques chez certains patients (trait pointillé) et/ou une activation constitutive de la protéine dans toutes les cellules B-LLC (remplissage plein) ou dans les cellules chez certains patients (remplissage dégradé).

### II.2.2.2.3. Régulateurs négatifs

**Shp1.** Bien que le niveau d'expression de Shp-1 soit plus faible dans de nombreux lymphomes et leucémies, il est équivalent entre les cellules B de LLC et les cellules B normales [270]. En revanche, la distribution intracellulaire de Shp-1 diffère entre les 2 modèles cellulaires. Retrouvée quasi-exclusivement dans le cytosol des cellules B normales, Shp-1 est localisée aussi bien dans le compartiment cytosolique qu'à la membrane plasmique dans les B-LLC quelque soit le statut du patient (M/UM ou Zap $^{+/-}$ ) [246]. Dans les cellules B normales, Shp1 lie les motifs ITIM de co-récepteurs du BCR tels que le CD22 pour déphosphoryler les motifs ITAM du BCR, Syk ou encore

Lyn [271]. Dans les cellules B-LLC, une autre phosphatase, la PTPN22, est surexprimée et déphosphoryle le CD22, empêchant la liaison de Shp-1 [270]. Dans les cellules B-1 normales, Shp-1 lie le motif ITIM du co-récepteur du BCR, le CD5. Les cellules B-LLC expriment le CD5 et celui-ci est associé à la sous-unité Ig $\alpha$  du BCR [272]. Le CD5 ainsi que le pool membranaire de Shp-1 sont constitutivement phosphorylés par Lyn (*Figure 29*). Cette phosphorylation conduit à l'activation de Shp-1, mesurée par une phosphorylation de ses résidus tyrosines 536 et 564, qui permet sa liaison au motif ITIM du CD5 et donc son recrutement au BCR et permet la déphosphorylation constitutive de Vav1. Le pool cytoplasmique de Shp-1, quant à lui, est phosphorylé sur le résidu sérine 591 qui reflète l'inhibition de la phosphatase. Ainsi, Shp-1 en modulant la phosphorylation de Vav1 participe à la régulation de l'axe Lyn-CD5-Shp1 sans modifier la phosphorylation des effecteurs Syk et Lyn pour activer la protéine anti-apoptotique Mcl-1 impliquée dans la résistance à l'apoptose des cellules B-LLC au repos [246]. Après ligation du BCR, Syk est recruté au BCR et Shp-1 est alors dissocié du BCR [272].

**c-Cbl.** Dans les cellules B-LLC, l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de c-Cbl est augmentée par rapport à celles mesurées dans cellules B normales. En revanche, le résidu tyrosine 700 de Cbl, décrit pour réguler Zap70 dans les cellules T, est retrouvé hypo-phosphorylé dans les cellules B leucémiques. Le taux de cette hypo-phosphorylation, rapporté à celui de l'expression de Zap70 ou de PLC $\gamma$ 2, est plus élevé dans les cellules leucémiques de patients au stade B que dans celles des patients au stade A de Binet. Décrit comme un régulateur négatif dans les cellules B normales, l'expression dérégulée de c-Cbl agirait comme un activateur de facteurs de transcription induisant la survie cellulaire dans les B-LLC [273].

### II.2.3. Dérégulation des voies d'activation et des facteurs de transcription

#### II.2.3.1. Voies de la survie cellulaire

Quel que soit le mode d'activation, qu'il provienne d'un signal tonique ou d'une stimulation antigénique, les cellules B-LLC reçoivent des signaux de survie et résistent à l'apoptose. L'une des principales voies conduisant à la survie des cellules B-LLC est celle impliquant les protéines PI3K et Akt. En produisant du PIP3, PI3K permet le recrutement à la membrane et l'activation d'Akt. Cette dernière est impliquée dans plusieurs voies de signalisation qui aboutissent non seulement à la survie mais également à la résistance à l'apoptose des cellules B-LLC *via* les protéines de la famille Bcl-2 (Bad, Mcl-1, Bcl-xL). En effet, en phosphorylant Bad, Akt libère la protéine anti-apoptotique

Bcl-2 et en phosphorylant IKK, elle active NF- $\kappa$ B qui induit la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Akt peut également inhiber l'apoptose en phosphorylant directement la caspase-9. Cependant, si PI3K est constitutivement activée dans les B-LLC, PI3K et Akt voient leur activité basale augmentée suite à une stimulation soutenue du BCR et entraînent l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 [233].

Dans les cellules non stimulées, le signal tonique conduit à l'activation constitutive de protéines associés au BCR telles que Syk (pY352) [233], Btk, PLC $\gamma$ 2 ou PI3K $\delta$  qui propagent des signaux de survie en utilisant les voies de signalisation comme la voie PLC $\gamma$ 2/PKC/MEK/ERK qui active NFAT [267] ou comme la voie PI3K/Akt qui permet l'activation de Mcl-1 [233]. La survie induite par le signal tonique est le résultat de l'activation constitutive des enzymes en aval du BCR finement régulées par des effecteurs négatifs tels que l'axe Lyn-CD5-Shp1.

Lors de la stimulation des cellules B-LLC avec un antigène extrinsèque, la signalisation du BCR est renforcée par l'expression ectopique de Lck [234] et de Zap70 [229]. En plus de la tyrosine 352, Syk est phosphorylée sur les résidus tyrosines de sa boucle d'activation (Y525/526) qui permettent l'activation d'effecteurs tels que Btk, PLC $\gamma$ 2 et PI3K et amplifient les voies ERK et Akt [232, 233, 274]. PI3K, quant à elle, est impliquée dans l'activation constitutive de PKC- $\delta$ . Contrairement aux cellules B normales où cette isoforme des PKC régule négativement la prolifération et positivement l'apoptose, la voie PI3K/PKC- $\delta$  est impliquée dans le défaut d'apoptose des cellules B-LLC [266, 267]. En effet, en stabilisant Mcl-1 phosphorylée par Akt, PKC- $\delta$  renforce la survie des cellules B-LLC [275].

La voie Akt/Mcl-1 contribue à la survie des cellules B-LLC non seulement par les voies dépendantes du signalosome de Syk suite à l'engagement du BCR [274] mais aussi par des voies indépendantes du BCR. En effet, le contact entre les cellules B-LLC et les cellules stromales, qui sécrètent du CXCL12 et expriment VCAM-1, active les voies CXCR4 et VLA-4 dépendantes de Syk et entraîne une phosphorylation d'Akt suffisante pour augmenter la demi-vie de Mcl-1 [231].

Les cellules anergiques survivent grâce à une activation constitutive de la voie ERK et du facteur de transcription NFAT, surexprimés dans les cellules B-LLC par rapport aux cellules B normales [276].

### **II.2.3.2. Voies de la prolifération cellulaire**

Comme décrit précédemment, la prolifération des cellules B-LLC est conditionnée par leur microenvironnement ganglionnaire dans les pseudo-follicules. En effet, une stimulation soutenue du BCR entraîne la sécrétion des chimiokines CCL3 et CCL4 par les B-LLC qui permettent le recrutement des cellules T. Ces dernières activent alors les cellules B-LLC par une interaction impliquant le couple récepteur/ligand CD40. La voie PI3K/Akt, qui est dépendante du CD40, induit alors l'expression de survivin et diminue l'expression de p27 dans les cellules de patients UM préférentiellement. L'ensemble de ces événements moléculaires conduit à une augmentation de la prolifération des cellules B-LLC qui sont positives pour l'expression du marqueur Ki-67 [277, 278].

Les NLC sont également capables d'activer les B-LLC par une interaction entre le CD31 et le CD38. En s'associant au CD38, Zap70 renforce les voies ERK 1/2 induites au cours de la prolifération des cellules B-LLC qui sont doublement positives pour ces deux protéines [211].

En résumé, les cellules capables de proliférer sont des cellules leucémiques présentant des facteurs pronostiques associés à une forme agressive de la LLC.

### **II.2.3.3. Voies de la migration**

L'expression forte du CXCR4 et du VLA-4 à la surface des cellules B-LLC périphériques et l'expression de leur ligand, le CXCL12 et le VCAM-1, par les cellules stromales et les NLC conduisent aux processus de chimiotactisme, de migration et d'adhérence des cellules leucémiques à travers les HEVs pour rejoindre les ganglions [208]. Une fois dans les ganglions, le CXCL12 transmet des signaux de survie aux B-LLC. De plus, la stimulation antigénique déclenche un signal *via* l'activation de Syk [213] et d'Akt, qui permet l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et régule négativement l'expression de CXCR4 dans les cellules des patients progressifs [214, 216]. Cette signalisation par le BCR empêche donc les B-LLC de migrer dans le sens contraire et donc de quitter les ganglions par la même voie empruntée lors de leur entrée [208, 231]. Ainsi, Syk et CXCR4 sont impliqués dans la rétention et l'accumulation d'un pool prolifératif de B-LLC dans les ganglions.

## **II.3. Traitements de la LLC**

Les traitements classiquement utilisés dans la LLC permettent de pallier aux signes cliniques de progression des patients mais le risque d'apparition de patients réfractaires ou en rechute (R/R)

reste non négligeable. La recherche de nouveaux traitements qui ciblent plus particulièrement les cellules B-LLC dans leur microenvironnement, dans lequel elles sont protégées et prolifèrent, a pris une ampleur considérable au cours des dernières années. Dans ce contexte, le CXCR4 et les kinases associées au BCR représentent des cibles thérapeutiques de choix.

### **II.3.1. FCR et BR en traitement de première ligne**

Actuellement, la première ligne de traitement standard des patients LLC consiste en une combinaison entre un anticorps anti-CD20, le Rituximab, et des molécules cytostatiques telles que la Fludarabine et le Cyclophosphamide (FCR) ou la Bendamustine (BR). La ligation du Rituximab sur le CD20 exprimé à la surface des cellules B-LLC entraîne une cytotoxicité dépendante du complément qui aboutit à l'apoptose (*Figure 30*) [279]. Quant aux molécules cytostatiques, le Cyclophosphamide ajoute des groupes alkyles sur les bases guanine de l'ADN rendant impossible sa réplication et initiant la réparation de l'ADN [280]. La Fludarabine est un analogue de la purine qui s'incorpore à l'ADN en cours de réplication et inhibe la réparation de l'ADN initiée par des agents alkylants. Entraînant l'apoptose par une voie dépendante de la protéine p53, les patients présentant une mutation du gène *P53* y sont résistants [280, 281]. La Bendamustine est à la fois un agent alkylant et un analogue des purines [282] (cf *Figure 30*).

### **II.3.2. Ciblage du microenvironnement**

Une fois dans les tissus lymphoïdes, les cellules B-LLC sont protégées de la plupart des agents thérapeutiques classiquement utilisés. Pour contourner cet handicap, une nouvelle stratégie consiste à mobiliser les cellules B-LLC hors de leur microenvironnement et d'empêcher leur "homing". Ainsi, le Lenalidomide, un immuno-modulateur dérivé du thalidomide, a fait l'objet d'un essai clinique de phase II (*Figure 30*). Son action passe par l'inhibition de cytokines telles que le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) et l'IL-7, ou encore des facteurs de croissance tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor). Testé en combinaison avec le Rituximab, le Lenalidomide montre un taux de réponse globale de 66%. Il est actuellement testé en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques [279, 283].

Par ailleurs, l'axe CXCR4-CXCL12 fait l'objet d'un développement d'inhibiteurs cliniques. En effet, plusieurs antagonistes du CXCR4, des anticorps anti-CXCR4 ou encore des antagonistes du CXCL12 ont été mis au point pour mobiliser les cellules B-LLC hors de leur microenvironnement protecteur vers le compartiment sanguin [208, 284]. L'AMD3100, découvert pour inhiber les HIV-1

et 2 (human immunodeficiency virus), s'est révélé être un antagoniste du CXCR4 [285]. Un essai clinique de phase I avec le Plerixafor, en combinaison avec du Rituximab chez les patients LLC, a bien montré une redistribution des cellules B-LLC dans le sang. D'autre part, une approche consistant à utiliser des oligonucléotides (NOX-A12) dirigés contre le ligand du CXCR4, le CXCL12, conduit à une inhibition de la migration et une sensibilisation des cellules B-LLC aux agents cytotoxiques. Un essai clinique de phase IIa utilisant le NOX-A12 en combinaison avec la Bendamustine et le Rituximab est en cours chez des patients (R/R) [208].

### **II.3.3. Ciblage des kinases de la voie du BCR**

Effectués sur des patients R/R, les premiers essais cliniques mettant en jeu des inhibiteurs de kinases montrent de bons taux de réponse globale accompagnés de peu d'effets secondaires. Cependant, leur action transitoire associée à un certain niveau de rechute poussent les cliniciens à les tester en combinaison avec les molécules classiquement utilisées dans les traitements en première ligne.

#### **II.3.3.1. Inhibiteurs de Lyn : le Dasatinib**

Le Dasatinib, développé pour cibler la kinase BCR-ABL dans la Leucémie Myéloïde Chronique, s'est avéré efficace dans l'inhibition de l'activité kinase de Lyn, Btk et d'autres kinases. *In vitro*, le Dasatinib inhibe la voie de signalisation du BCR (pSyk, pPLC $\gamma$ 2), l'expression de Bcl-2 et la survie des cellules B-LLC même en présence de signaux de survie tels que le CD40L ou l'IL-4 [259, 284]. Il inhibe également le chimiotactisme, la polymérisation d'actine et l'adhérence des cellules B-LLC [284]. Cependant, le Dasatinib est plus efficace *in vitro* chez les patients présentant les facteurs de mauvais pronostic (UM, Zap<sup>+</sup>) [259]. Testé seul ou en combinaison avec la Fludarabine en phase II chez les patients R/R, cette drogue a montré peu d'efficacité comparée aux inhibiteurs de Syk, Btk ou PI3K- $\delta$ . Ces résultats pourraient être dus au fait que Lyn fonctionne comme un régulateur négatif du BCR *in vivo* [284].

#### **II.3.3.2. Inhibiteur de Syk : le FosD**

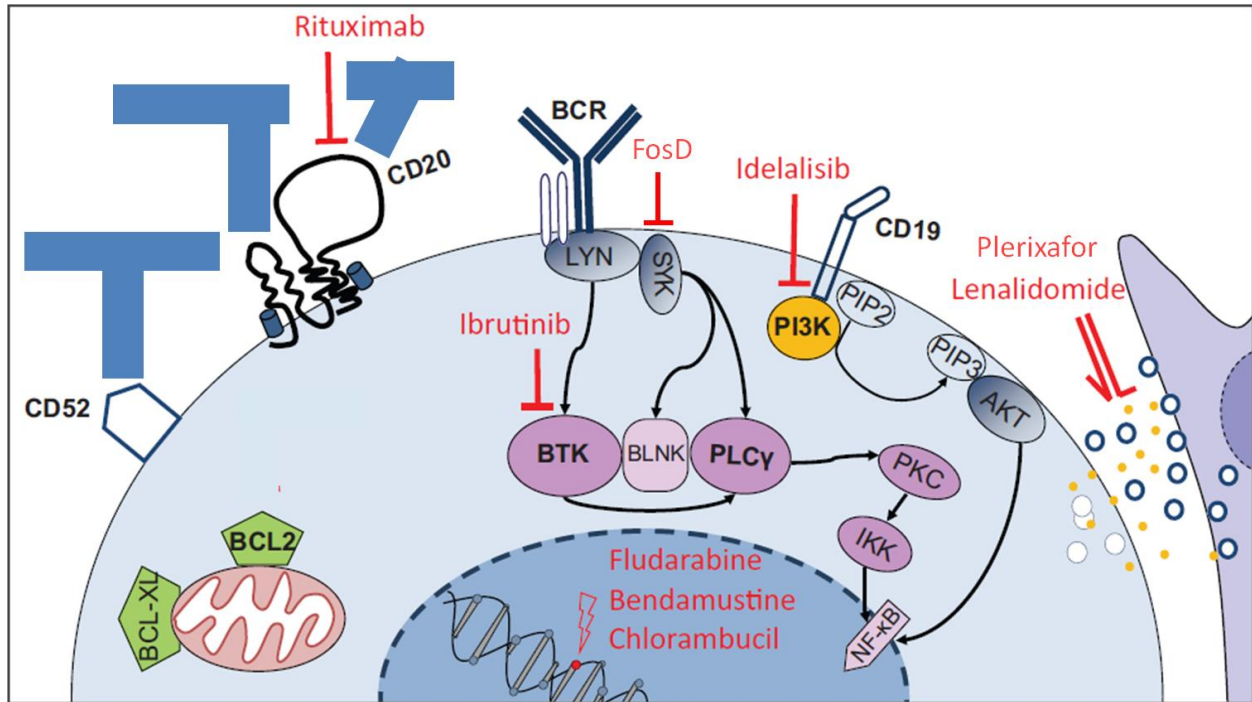
Le FosD (fostamatinib disodium, R788) est la forme inactive et orale du R406 qui agit comme un inhibiteur compétitif de Syk (*Figure 30*). En se fixant sur son site de liaison à l'ATP, le R406 bloque ainsi son activité kinase. Il n'est pas spécifique de Syk car il inhibe également d'autres kinases telles que Flt3, Jak ou Lck [286, 287]. Initialement, le FosD a été développé pour traiter les

patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde [288] avant d'être testé *in vitro* sur des cellules B-LLC. L'inhibition de Syk par le R406 entraîne une diminution de la phosphorylation de Syk et de ses cibles tout en induisant l'apoptose des cellules B-LLC. L'effet cytotoxique du R406 s'est révélé être plus fort dans les B-LLC des patients UM ou Zap70<sup>+</sup> où Syk est sur-exprimée [257]. Combiné à la Fludarabine, le R406 diminue la viabilité des B-LLC et ce, plus que ne le fait un traitement par la Fludarabine seule. En effet, la Fludarabine provoque la déphosphorylation du facteur de transcription Stat1 alors que le R406 aboutit à la déphosphorylation de Stat3. La déphosphorylation de ces 2 facteurs interfère alors avec leur dimérisation et avec l'induction de l'expression de gènes de survie et anti-apoptotiques. De plus, le R406 inhibe la sécrétion des chimiokines CCL3 et CCL4 des cellules B-LLC en co-culture avec les cellules stromales, suggérant que cet inhibiteur est capable d'interférer avec l'effet protecteur des cellules avoisinantes. Son action est plus importante sur les cellules stimulées par le CD40L, suggérant que le R406 cible les cellules prolifératives [207, 231]. Pour mieux définir les effets du R406 *in vivo*, cet inhibiteur a été testé dans le modèle murin TCL1. Ces souris transgéniques, qui sur-expriment la protéine Tcl-1 humaine, récapitulent la forme agressive de la LLC (CD5<sup>+</sup>, BCR stéréotypés, IgVH UM). Dans ce modèle animal, le R406 inhibe efficacement la signalisation du BCR dépendante de l'antigène, entraînant une diminution de la survie et de la prolifération des cellules B leucémiques uniquement [226].

Un essai clinique de phase I/II avec le R406 révèle des résultats prometteurs avec un taux de réponse globale à 55% et des effets indésirables acceptables. Cette réponse comprend une redistribution des B-LLC avec une diminution du volume ganglionnaire [217, 284]. Pour améliorer la réponse globale, les recherches actuelles développent des combinaisons entre le R406 et d'autres traitements utilisant des anticorps monoclonaux ou d'autres inhibiteurs. Au regard des effets "off-target" du R406, le développement d'inhibiteurs plus spécifiques de l'activité kinase de Syk est également d'actualité [226]. Dans ce contexte, les molécules P505-15 et le PRT318 se révèlent être des inhibiteurs de l'activation de Syk, ainsi que de ses cibles, et entraînent une réduction de la viabilité cellulaire, une diminution de la sécrétion des chimiokines CCL3 et CCL4 et de la migration *in vitro* [226, 289, 290]. En combinaison avec la Fludarabine, le P505-15 agit en synergie avec l'effet cytoréducteur de la Fludarabine [290]. Les essais *in vivo* restent à venir.



Un autre inhibiteur de Syk, le GS-9973, inhibe la signalisation du BCR, diminue la viabilité et la croissance cellulaires et réduit la sécrétion des CCL3 et CCL4 en combinaison avec l'inhibiteur de PI3K, l'Idelalisib, *in vitro* [291]. Un essai clinique de phase II du GS-9973 est en cours [284].



**Figure 30. Agents thérapeutiques utilisés dans les traitements de la LLC (adapté de Tausch et al., 2014) [279].** Le Rituximab est un anticorps dirigé contre le CD20 exprimé par les cellules B de LLC et cette immunothérapie conduit à l'apoptose cellulaire. Le FosD, l'Ibrutinib et l'Idelalisib sont des composés qui inhibent respectivement l'activité kinase de Syk, Btk et PI3K- $\delta$  et qui bloquent notamment la signalisation du BCR dans les cellules B-LLC. Le Lenalidomide, un inhibiteur de cytokines, et le Plerixafor, un antagoniste du CXCR4, sont considérés pour bloquer l'effet protecteur du microenvironnement vis-à-vis des cellules B-LLC.

### II.3.3.3. Inhibiteur de Btk : l'Ibrutinib

L'Ibrutinib (PCI-32765) inhibe la phosphorylation et l'activité enzymatique de Btk en se fixant spécifiquement et irréversiblement sur la cystéine 481 du domaine kinase (*Figure 30*). Il bloque les signaux de survie et de prolifération et entraîne l'apoptose des cellules B-LLC. Il interfère également avec le homing des cellules B de LLC vers le CXCL12 et le CXCL13 ainsi que la sécrétion de CCL3 et CCL4. Ainsi, l'Ibrutinib interfère avec l'effet protecteur du microenvironnement sur les B-LLC [253, 255]. Il en résulte une redistribution transitoire des B-LLC depuis les tissus lymphoïdes vers la circulation sanguine dans le modèle murin TCL1 [255] et dans environ deux tiers des

patients traités [278]. Des essais en phase Ib-II montrent une réponse partielle dans 50 % des cas, et une rémission durable chez les patients R/R, incluant des patients avec des facteurs génétiques à risque [284]. Il est intéressant de noter que malgré l'absence de mutation récurrente des gènes *BTK* et *PLCγ2* dans les cellules B-LLC, certains patients développent une résistance à l'Ibrutinib en acquérant des mutations de ces gènes. La mutation Btk (C481S) entraîne une inhibition réversible de Btk par l'Ibrutinib tandis que les mutations de PLCγ2 augmentent son activité et provoquent une signalisation autonome du BCR [260]. Cependant, l'Ibrutinib est très bien toléré et a été récemment approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour être utilisé chez les patients LLC R/R. Reste à tester l'Ibrutinib en combinaison avec de la chimiothérapie classique ou avec des anticorps monoclonaux pour réduire encore la lymphocytose et augmenter les taux de rémission complète [284].

#### **II.3.3.4. Inhibiteur de la PI3Kδ : l'Idelalisib**

L'Idelalisib (GS-1101 ou CAL-101) est un inhibiteur réversible et spécifique de la PI3Kδ [178] (*Figure 30*) qui diminue la survie des B-LLC *in vitro* et inhibe la migration ainsi que les signaux venant du microenvironnement sans être cytotoxique envers les cellules immunes normales [264, 292]. Même si son mécanisme d'action reste en partie inconnu, l'Idelalisib semble agir en réduisant les interactions qui retiennent les B-LLC dans les tissus plutôt qu'en inhibant les signaux de survie [208]. Les essais de phase I chez des patients R/R montrent une redistribution des cellules B-LLC et une diminution du volume ganglionnaire dans 80% des patients traités aboutissant à une réponse globale de 72% [284]. Testé en combinaison avec le Rituximab et/ou la Bendamustine, il donne des taux de réponse similaires dans les trois cas. Un essai clinique de phase II révèle qu'en combinaison avec le Rituximab, le taux de réponse global s'élève à 81% quel que soient les facteurs pronostiques des patients. Cette combinaison a finalement été acceptée comme solution de traitement en 2014 [279].

## OBJECTIFS DE LA THESE

L'homéostasie des cellules B normales est régulée par les voies de signalisation déclenchées par l'engagement du BCR. La liaison d'un antigène à son récepteur entraîne la formation d'un signalosome précoce, constitué de la protéine kinase Syk [26] et de différents effecteurs qui permettent la transmission de divers signaux [50, 59]. Des altérations de la signalisation du BCR entraîne une dérégulation de l'homéostasie B comme c'est le cas dans la LLC [293]. Cependant, les connaissances physiopathologiques sur la LLC restent limitées et ne permettent pas une évaluation du risque individuel de progression à un stade précoce de la maladie. Il est donc nécessaire de mettre en évidence des biomarqueurs de stratification de la LLC.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'une stimulation antigénique *ex-vivo* des cellules B de patients LLC aboutit à une survie cellulaire différentielle, permettant de distinguer les cellules non-répondeuses "NR" des cellules répondeuses "R" [199]. Par ailleurs, notre équipe a montré que la stimulation antigénique entraînait, dans les cellules R, une diminution de l'expression membranaire de protéines impliquées dans la migration cellulaire, tel que le CXCR4 [214]. Cette altération de l'interaction avec le microenvironnement pourrait expliquer l'accumulation d'un pool prolifératif de cellules de B-LLC dans les ganglions.

Sur la base de ces résultats, l'ensemble de mes travaux vise à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la transmission du signal par l'antigène et qui aboutissent à une survie et à une migration différentielles entre les cellules R et NR. Les trois objectifs de mon projet de thèse sont les suivants :

1. Etude de l'expression et de l'activation d'effecteurs de la voie du BCR comme déterminants dans l'établissement d'un seuil de réponse à une stimulation antigénique aboutissant à une survie différentielle entre cellules R et NR ; détermination d'une corrélation entre la survie des cellules et la survie des patients;

2. Caractérisation des cinétiques de phosphorylation et de formation des complexes de Syk dans les cellules NR et R, ainsi qu'évaluation fonctionnelle de l'interactome de Syk aboutissant à l'avantage de survie des cellules R en réponse à une stimulation antigénique;

3. Caractérisation des intermédiaires de la signalisation du BCR impliqués dans l'internalisation du CXCR4 dans les cellules NR et R.



## RESULTATS

### ARTICLE 1 : Implication des intermédiaires de la signalisation du BCR dans l'évolutivité de la LLC

Mon objectif consiste à mieux comprendre comment des dysfonctionnements de la régulation des intermédiaires du BCR et leurs complexes de signalisation contribuent au développement de désordres lymphoïdes. Les précédents travaux de notre laboratoire ont montré que la réponse en termes de survie des cellules B de LLC suite à une stimulation antigénique permet de distinguer les patients présentant préférentiellement une forme stable de la maladie (patients non-répondeurs NR) de ceux développant une forme évolutive (patients répondeurs R) [199]. En revanche, les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette hétérogénéité fonctionnelle, ainsi que la corrélation entre la survie cellulaire des cellules B malignes *ex-vivo* et la survie des patients, n'étaient pas établis.

Après consentement éclairé des patients LLC, des échantillons de sang frais et leurs annotations clinico-biologiques ont été obtenus par le laboratoire d'Hématologie Biologique (Pr. F. Cymbalista, Hôpital Avicenne) et l'Unité de Recherche Clinique (URC, Pr. V. Lévy, Hôpital Avicenne). Une mesure de l'activité métabolique (% MTS) des cellules leucémiques stimulées par un anti-IgM pré-fixé a permis de distinguer 2 groupes de patients : les répondeurs R et les non-répondeurs NR. Les niveaux d'expression des récepteurs, effecteurs précoces et tardifs du BCR dans les cellules B ont été mesurés par les approches de PCR quantitative, de cytométrie en flux et d'immunoprécipitation suivie d'un western blot. La détection de potentielles altérations chromosomiques affectant les loci des gènes Syk et NFAT2 a été réalisée par la technique de FISH (Pr. V Eclache, Hôpital Avicenne). La localisation subcellulaire de NFAT2 a été déterminée par la technique d'immunofluorescence suivie d'une analyse en microscopie confocale. La capacité de NFAT2 à lier l'ADN a été mesurée par un test ELISA. Les courbes de survie et de progression ont été déterminées par la méthode de Kaplan-Meier (M Boubaya; URC).

Nos résultats montrent qu'une stimulation antigénique *in vitro* induit un avantage de survie des cellules B de LLC chez certains patients permettant ainsi de définir les patients répondeurs R. Cet

avantage de survie est dépendant d'un seuil imposé par les niveaux d'expression de l'IgM de surface constituant le BCR et/ou de ses effecteurs intracellulaires précoces comme Syk. La phosphorylation de Syk, l'activation de la PLC $\gamma$ 2 et, la mobilisation du calcium intracellulaire reflètent la capacité des cellules B malignes à répondre à un engagement du BCR. Malgré une surexpression de NFAT2 dans toutes les cellules B de LLC, seuls les lymphocytes B bénéficiant d'un avantage de survie montrent une hausse de la capacité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription suite à une stimulation antigénique. Un blocage spécifique de l'activation de NFAT par le peptide VIVIT abolit l'avantage de survie des cellules B. A l'opposé, l'induction de NFAT par l'ionomycine confère aux cellules NR un phénotype de réponse. Excluant un défaut d'activation du facteur de transcription dans les cellules NR, ces résultats renforcent la dépendance du signalosome précoce du BCR vis à vis de la réponse antigénique des cellules R. Enfin, l'activation de la voie BCR/NFAT, mesurée par la survie des cellules B de LLC induite par une stimulation antigénique *ex-vivo*, est corrélée à la survie globale des patients avec une probabilité de survie plus faible chez les patients R.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Blood* dont je suis le quatrième auteur. Ces données montrent comment des altérations de l'expression ou de l'activation des composants de la cascade de signalisation du BCR participent à la physiopathologie de la LLC. Elles démontrent pour la première fois l'existence d'un seuil de réponse à l'antigène établi par les protéines du signalosome précoce du BCR et l'implication fonctionnelle du facteur de transcription NFAT2 dans la survie des cellules B de LLC. Ces travaux mettent également en évidence des biomarqueurs fonctionnels de l'évolutivité de cette hémopathie (phosphorylation de Syk et de la PLC $\gamma$ 2, activation de NFAT2) tout en pointant d'éventuelles cibles thérapeutiques. L'établissement d'une corrélation entre la survie des cellules pathologiques suite à une stimulation antigénique *ex-vivo* et la survie globale des patients confirme que notre test *in vitro*, qui distingue deux groupes de patients LLC, a une valeur prédictive dans l'étude du devenir des patients.

## The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia

\*Christine Le Roy,<sup>1,2</sup> \*Pierre-Antoine Deglesne,<sup>2,3</sup> \*Nathalie Chevallier,<sup>2,3</sup> Taoufik Beitar,<sup>3</sup> Virginie Eclache,<sup>1-3</sup> Maude Quettier,<sup>1,2</sup> Marouane Boubaya,<sup>4</sup> Rémi Letestu,<sup>1-3</sup> Vincent Lévy,<sup>4</sup> Florence Ajchenbaum-Cymbalista,<sup>1-3</sup> and Nadine Varin-Blank<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Inserm U978, Bobigny, France; <sup>2</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, "Adaptateurs de Signalisation en Hématologie," Labex "Inflamex," Unité de Formation et de Recherche Santé-Médecine-Biologie Humaine, Bobigny, France; <sup>3</sup>Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service d'Hématologie Biologique, Bobigny, France; and <sup>4</sup>Hôpital Avicenne, AP-HP, Unité de Recherche Clinique, Bobigny, France

**B-cell antigen receptor (BCR)-mediated signaling plays a critical role in chronic lymphocytic leukemia (CLL) pathogenesis and gives an in vitro survival advantage to B cells isolated from patients with unfavorable prognostic factors. In this study, we undertook to elucidate the signaling intermediates responsible for this biologic alteration. In responding cells only, in vitro BCR engagement triggers global phosphorylation of Syk, activation of phospholipase C $\gamma$ 2, and intracellular**

**calcium mobilization, reflecting competency of BCR signaling. The calcium-calcieneurin-dependent transcription factor NFAT2 is up-regulated and to some extent constitutively activated in all CLL B cells. In contrast, its DNA-binding capacity is enhanced on IgM stimulation in responding cells only. NFAT inhibition using the VIVIT peptide prevents induction of *CD23* target gene and IgM-induced survival, converting responding cells to unresponsive status. At the opposite,**

**ionomycin-induced NFAT activity allows survival of nonresponding cells. These results demonstrate that the functional heterogeneity relies on variability of protein levels establishing BCR-dependent thresholds and NFAT-dependent activation. Finally, status of the BCR-NFAT pathway for each patient reveals its relevance for CLL clinical outcome and points out to BCR-NFAT intermediates as promising functional therapeutic targets. (*Blood*. 2012;120(2):356-365)**

### Introduction

Despite encouraging scientific and therapeutic advances, chronic lymphocytic leukemia (CLL) disease remains incurable with standard therapy, prompting the need for the development of novel therapeutic agents. CLL affects predominantly elderly people and, based on clinical and biologic annotations, the course of the disease can be classified from indolent to more aggressive subtypes.<sup>1-5</sup> CLL is defined as an expansion of monoclonal, slowly dividing CD5<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B lymphocytes. An important prognosis factor for CLL patients is the mutational status of *immunoglobulin (Ig) variable heavy chain* genes (IGHV) constituting the IgM B-cell antigen receptor (BCR). Considerable amounts of data have shown that antigen-driven signals are involved in the pathogenesis and progression of CLL malignancies.<sup>6-9</sup> Although CLL cells accumulate and are resistant to cell death in vivo, they rapidly become apoptotic during in vitro culture. Interestingly, several CLL cells evade apoptosis in vitro through an enhanced survival response after BCR stimulation.<sup>6,7,9,10</sup> After BCR triggering, which is mediated by antigen binding to cell surface Igs, prolonged activation of the MEK-ERK and PI3K-AKT pathways, as well as efficient degradation of I $\kappa$ B and activation of NF- $\kappa$ B have been associated with the induction of antiapoptotic and survival signals.<sup>11-13</sup> These molecular events lead to important changes in gene transcription and subsequent B-cell fate specification.<sup>7,14</sup> In addition, sustained BCR engagement promotes increased metabolic activity, allowing some restricted G<sub>1</sub> cell-cycle progression.<sup>6,15</sup>

Most CLL cells characteristically display lower levels of surface IgM and IgD compared with normal B cells.<sup>1,2,15</sup> Low BCR surface expression is partly explained by an inefficient assembly, trafficking, or both of Igs that are noncovalently bound to CD79a and CD79b.<sup>16</sup> The tyrosine kinase Syk has been shown to function downstream of the BCR complex in CLL B cells.<sup>8,17</sup> Inhibition of Syk expression or activity induces apoptosis of CLL cells both in vitro and in vivo, suggesting a prosurvival role for the kinase.<sup>18-22</sup> Zap70, the second member of the Syk family, is considered a surrogate marker for unmutated IGHV gene expression and probably facilitates BCR signaling in CLL cells independently from its tyrosine kinase activity.<sup>23,24</sup> Effectors downstream of Syk include, among others, phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) that is responsible for mobilization of intracellular pools of calcium.<sup>14,25</sup> In CLL B cells, BCR ligation induces heterogeneous responses in terms of PLC $\gamma$ 2 phosphorylation and intracellular calcium mobilization.<sup>15,26</sup> In turn, sustained calcium uptake activates the serine and threonine phosphatase calcineurin. Once active, calcineurin promotes dephosphorylation and nuclear translocation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors, which cooperate with other factors to promote transcriptional regulation of numerous survival genes in lymphocytes.<sup>27,28</sup> Although nuclear NFAT1 may present as a hallmark of unstimulated CLL B cells, the molecular events that lead to activation of NFATs and cell survival remain to be determined.<sup>29</sup>

Submitted December 6, 2011; accepted April 29, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 21, 2012; DOI 10.1182/blood-2011-12-397158.

\*C.L.R., P.-A.D., and N.C. contributed equally to this study.

The online version of the article contains a data supplement.

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

© 2012 by The American Society of Hematology

Based on the heterogeneous response of CLL B cells in terms of *in vitro* cell survival on BCR ligation, we demonstrated previously that the responsiveness allows the distinction between 2 “responder” and “nonresponder” groups of patients. The responder group, characterized by cells with an elevated response in terms of transcriptional targets after sustained BCR stimulation, includes patients with unfavorable prognostic factors.<sup>6</sup>

We show in the present study that the levels of cell surface IgM and intracellular Syk, Zap70 proteins, or a combination mandate a critical threshold to promote BCR signaling in CLL B cells. Moreover, BCR competency is dependent on global phosphorylation of Syk but not Zap70, PLC $\gamma$ 2 activation, and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in CLL B cells from the responder cases. Importantly, endogenous NFAT2 that is overexpressed and binds DNA in all unstimulated CLL B cells is further activated after sustained BCR stimulation in “responding” B cells only. Treatment of CLL B cells with the VIVIT peptide inhibitor antagonized the BCR-dependent stimulation of NFAT2 and blocked cell survival. The relevance of this activating pathway is demonstrated through measurement of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in CLL patients. Together, our data show that targeting BCR-mediated pathways and its downstream intermediates may be a promising therapeutic approach in CLL.

## Methods

### CLL B-cell purification

After informed consent and in accordance with the Declaration of Helsinki, peripheral blood samples were obtained from patients fulfilling diagnostic and immunophenotypic criteria for CLL (supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) at the Service d’Hématologie Biologique, Avicenne Hospital, Bobigny. B cells were purified by negative selection using RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies) following the manufacturer’s instructions, and purity was verified as described previously.<sup>6</sup> Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on density gradient and further analyzed either freshly or after viable thawing from liquid nitrogen storage in fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories) and 10% DMSO (Sigma-Aldrich). Jurkat cell lines were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin (PAA Laboratories).

### Metabolic activity

Two million CLL cells (purified B cells or PBMCs) were cultured for 72 hours in 24-well plates coated or not with rabbit anti-IgM antibody (10  $\mu$ g/well; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Metabolic activity was determined using CellTiter 96AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to the manufacturer’s instructions. Metabolic fold increase ([percentage of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], inner salt [MTS]) was determined as follows: [(absorbance stimulated  $t = 72$  hours) – (absorbance unstimulated  $t = 72$  hours)]/(absorbance unstimulated  $t = 72$  hours)  $\times 100$ ; MTS values greater than or equal to 25% and less than 25% defined the responder and nonresponder CLL groups, respectively.<sup>6</sup> NFAT peptide inhibitor (11 R-VIVIT; Calbiochem) was added to cell culture media 45 minutes before IgM stimulation at final concentrations of 2 or 5  $\mu$ M; ionomycin (Sigma-Aldrich) was incubated for 30 minutes at final concentrations of 1, 2, or 5  $\mu$ M.

### Immunoprecipitation and immunoblotting

Purified B cells ( $1 \times 10^7$ ) stimulated or not were lysed in 0.5% nonidet P-40 lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM sodium chloride, and 1mM EDTA). Immunoprecipitations were carried out using monoclonal anti-

phosphotyrosine (4G10 Platinum; Millipore) or anti-human Syk (clone 4D10; BD Biosciences Pharmingen) monoclonal antibodies (mAb). After adsorption of the complex on protein G-Sepharose, beads were washed 3 times with 0.1% nonidet P-40 lysis buffer and subjected to immunodetection with the indicated antibodies (anti-Syk and -Zap70 mAbs; BD Biosciences Pharmingen). Detection was achieved using chemiluminescence (Pierce Chemical).

### Flow cytometric assays

**Membrane staining.** Expression of cell surface molecules was analyzed by flow cytometry, using the following mAbs: anti-CD20/APC-Cy7, CD19/APC-Cy7, CD5/PerCP-Cy5.5, CD3/PE-Cy7, CD23/PE, CD71/FITC (BD Biosciences), IgM/RPE (Dako), or relevant isotypic controls (BD Biosciences and Dako). In brief, fresh blood samples free of red blood cells, thawed PBMCs, or purified B cells were incubated in RPMI 1640 (PAA Laboratories) in the presence or not of soluble AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-human IgM (10  $\mu$ g/mL/ $10^6$  cells; Southern Biotechnology) for 10 minutes. Cells were further labeled in  $1 \times$  phosphate-buffered saline (PBS) containing saturating concentrations of mAbs for 20 minutes, washed twice, and then analyzed immediately or further subjected to intracellular labeling.

**Phosflow assay.** Phosphorylated-Syk/Zap70 (Alexa Fluor 647 anti-pY352 Syk/Zap70 pY319) and -PLC $\gamma$ 2 (PE anti-PLC $\gamma$ 2 pY759) as well as Syk and Zap70 (FITC-conjugated anti-Syk; BD Biosciences Pharmingen and R-PE anti-Zap70; Southern Biotechnology mAbs) were analyzed simultaneously using Lyse/Fix Buffer and Perm Buffer I (BD Biosciences), according to the manufacturer’s protocols. Data were acquired and analyzed with a BD FACSCanto II analyzer and DIVA software (BD Biosciences).

**Detection of intracellular calcium.** One million CLL B cells were washed in Cell Loading Buffer (1mM calcium, 1mM magnesium, and 1% FBS) and incubated with 2  $\mu$ M calcium indicator (fluo-4 AM; Invitrogen) for 30 minutes at 37°C in the dark. After further washing, cells were incubated in Cell Loading Buffer for 30 minutes at 37°C in the dark and finally analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II and DIVA software) for 300 seconds (stimulation was performed with 10  $\mu$ g of  $\alpha$ -IgM/mL/ $10^6$  cells at  $t = 60$  seconds and 5  $\mu$ M ionomycin at  $t = 290$  seconds).

### Immunofluorescence staining

Unstimulated or IgM-stimulated B cells were seeded on polylysine-coated coverslips for 30 minutes at 37°C and eventually stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 minutes and permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. After incubation for 45 minutes in blocking solution (PBS and 5% skimmed milk), anti-NFAT2 Ab (1:500; Ozyme) was applied at room temperature for 1 hour. Coverslips were further washed in PBS and incubated with Alexa 488-coupled secondary Ab (1:1000; Invitrogen) for 1 hour at room temperature. Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma-Aldrich) before slide mounting with Mowiol (Sigma-Aldrich).

### RT-PCR

Total RNAs from CLL patient or healthy donor B cells were purified (QIAGEN) and quantified by spectrophotometry. cDNAs were synthesized using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Amplification was performed in triplicates using SYBR Green PCR Mastermix and the appropriate primers (supplemental Methods; 10  $\mu$ M, Applied Biosystems) using a 7000 SDS thermal cycler (Applied Biosystems).

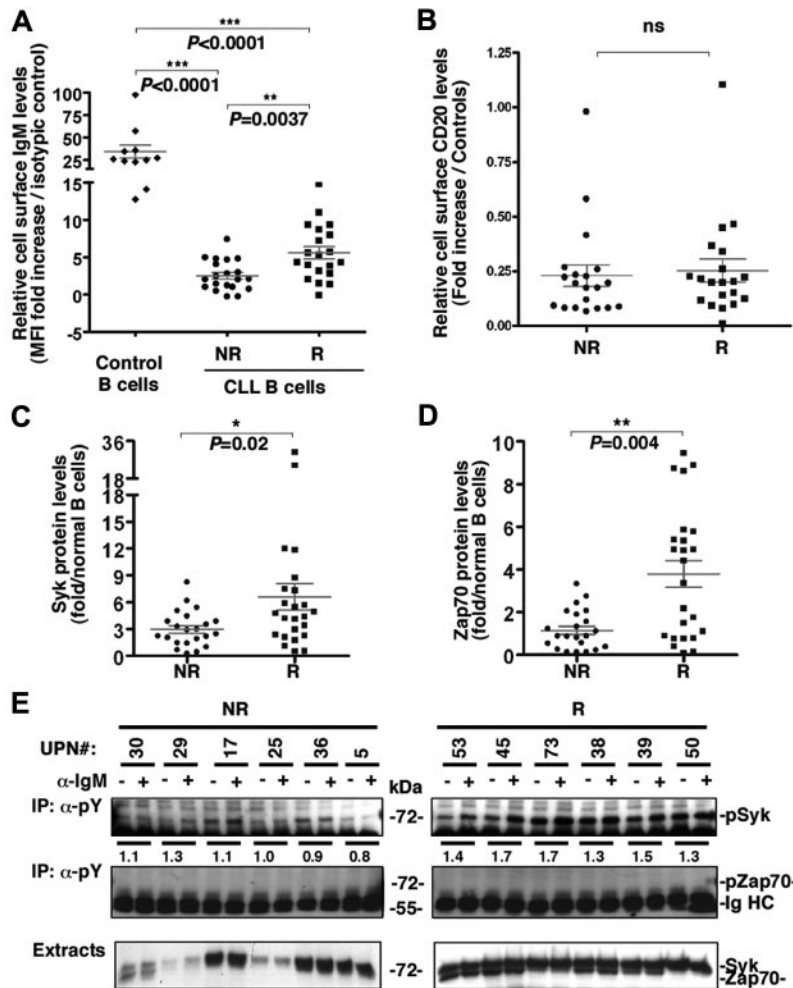
### ELISA for NFAT2 DNA-binding activity

NFAT2 DNA-binding capacity was measured using TransAM NFATc1 kit (Active Motif) according to the manufacturer’s instructions (supplemental Methods).

### Data analysis and statistics

Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test as appropriate. *P* values of





**Figure 1. Cell surface IgM levels as well as expression and global phosphorylation levels of Syk reflect CLL B-cell responsiveness.** Presence of surface IgM (A), CD20 (B), or Syk (C) and Zap70 (D) kinase levels was assayed on normal (control) and CLL B cells using flow cytometry analysis. (A) Cell surface IgM levels were calculated and graphed relative to control isotype labeling for 11 controls, 20 nonresponder (NR) samples, and 20 responder (R) samples. MFI indicates mean fluorescence intensity. (B-D) Cell surface CD20 expression on 20 NR and 20 R patients and intracellular Syk and Zap70 on 22 NR and 24 R cases were evaluated and graphed relative to control B cells. Means ( $\pm$  SEM) and significant  $P$  values are indicated (ns denotes not significant). (E) Anti-phosphotyrosine immunoprecipitation ([IP];  $\alpha$ -pY) was performed on cellular extracts of NR ( $n = 6$ ) and R ( $n = 6$ ) CLL B cells. Cells were either left unstimulated (-) or stimulated (+) with anti-IgM ( $\alpha$ -IgM) antibody. Precipitates were analyzed with anti-Syk or anti-Zap70 antibodies, allowing detection of pSyk and pZap70. Total extracts are analyzed as a control for Syk and Zap70 expression. Fold increase is calculated as a ratio between stimulated and unstimulated levels.

less than .05 were considered statistically significant. A 2-tailed unpaired Student  $t$  test was used to compare individual groups. A level of  $P$  less than .05 was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad software. Distributions of PFS and OS were estimated by the Kaplan-Meier method. Log-rank test was performed to test the difference of survival between groups.

## Results

BCR triggering with anti-IgM immobilized antibodies promotes a heterogeneous cell survival response that allowed us classifying CLL patients into 2 responder and nonresponder groups. Although responder CLL B cells exhibited increased metabolic activity, nonresponder cells showed no significant enhancement.<sup>6</sup> Assessment of the metabolic activity of CLL cells on BCR stimulation (% MTS) on a cohort of 77 untreated CLL patients lead to their sorting into 2 subgroups: 37 nonresponder and 40 responder patients (supplemental Table 1).

We observed previously an elevated transcriptional response on BCR stimulation in CLL cells isolated from responder patients only. To dissect this functional heterogeneity between the 2 groups of patients, we examined whether B-cell survival might result from differential expression, activity, or localization of signaling effectors.

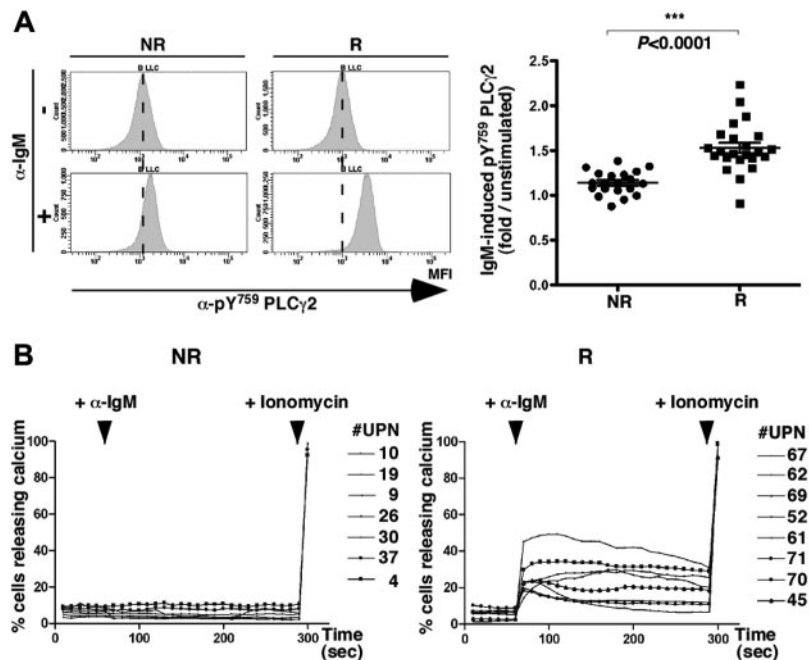
### Membrane IgM, but not CD20 coreceptor, has higher levels of expression in responding B cells

Low levels of surface IgM are the hallmark of CLL B cells.<sup>16</sup> We analyzed whether cell surface IgM levels might diverge between nonresponder and responder cases. Relative IgM surface expression was determined using flow cytometry on CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> B cells isolated from nonresponder ( $n = 20$ ) and responder ( $n = 20$ ) patients and compared with non-CLL B cells (control;  $n = 11$ ). Despite the expected overall lower membrane expression in CLL B lymphocytes compared with control B cells, leukemic B cells from responder cases exhibited significantly higher IgM levels than those from nonresponder cases ( $P = .0037$ ; Figure 1A and supplemental Figure 1A). In contrast, no significant difference was observed for the CD20 marker that participates to and modulates the BCR signaling complex, between nonresponder ( $n = 20$ ) and responder ( $n = 20$ ) groups (Figure 1B and supplemental Figure 1B). These results demonstrate a variation in the antigen-binding components of the complex, arguing for a critical level of signaling capacity in CLL B lymphocytes.

### Syk and Zap70 levels of expression are higher in responding CLL B cells

On triggering, BCR complex-driven signals propagate through intracellular protein tyrosine kinase of the Syk family. Therefore, Syk and Zap70 protein expressions were analyzed in CLL B cells

**Figure 2. BCR triggering promotes PLC $\gamma$ 2 phosphorylation and calcium mobilization in responding CLL B cells.** (A) Phospho-Y759-PLC $\gamma$ 2 levels were analyzed using a specific PE-coupled antibody in CLL B cells (CD20<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) by flow cytometry analysis. Histogram plots show pY759 PLC $\gamma$ 2 MFI in unstimulated ( $\alpha$ -IgM<sup>-</sup>, top) and stimulated ( $\alpha$ -IgM<sup>+</sup>, bottom) B cells from 1 representative patient for each CLL group (NR, left; R, right). Phospho-PLC $\gamma$ 2 was measured for 43 samples after 10 minutes of incubation with anti-IgM antibody in NR (n = 20, black dots) and R (n = 23, black squares) cases, calculated as fold induction over unstimulated cells and graphed. (B) Calcium release curves established in NR (n = 7, left) and R (n = 8, right) cases. After 60-second stabilization, CLL B cells were stimulated with anti-IgM antibody (+  $\alpha$ -IgM) followed at 290 seconds by ionomycin addition (+ ionomycin).



and compared with those of normal B cells using flow cytometry. Consistent with previously published results,<sup>30</sup> Syk protein levels were more abundant in most of CLL B cells compared with normal B lymphocytes (Figure 1C and supplemental Figure 2A). Interestingly, significantly higher levels of Syk were detected in the responding B cells compared with nonresponding cells ( $P = .02$ ; Figure 1C). FISH analysis confirmed that the overexpression of Syk protein was not because of genetic amplification of *SYK* gene (supplemental Figure 2B). As already reported,<sup>6</sup> Zap70 was detected more in responding cells respective to nonresponding cells and normal B lymphocytes ( $P = .004$ ; Figure 1D). Together, these results suggested that high IgM, Syk, and Zap70 protein contents might contribute to reach a critical responsiveness threshold on BCR engagement in responding CLL B cells.

#### Global Syk phosphorylation reflects activation of the responding CLL B cells

We next investigated the constitutive and stimulation-dependent phosphorylation of Syk family members in nonresponding and responding B cell lysates (Figure 1E). Higher levels of constitutive phospho-Syk were detected in responding cells compared with nonresponding cells. Furthermore, although phospho-Syk levels remained low in nonresponding cells on IgM stimulation, increase of phospho-Syk was systematically detected in responding cells. Despite the presence of a substantial amount of Zap70 in some extracts, we did not observe any constitutive or IgM-induced Zap70 phosphorylation. Together, the differences in Syk expression and phosphorylation status in our patient samples are not only reflective of constitutive differences in BCR activation but also of a differential signaling capacity between responding and nonresponding leukemic cells.

Because several tyrosine residues of Syk are targeted for phosphorylation on BCR stimulation, we next examined the phosphorylation status of tyrosine 352 (Y352) by immunoblotting. Although the phosphorylation of Y352 was higher in responding CLL B cells compared with nonresponding cells, enhanced phosphorylation of this particular residue was not observed on IgM

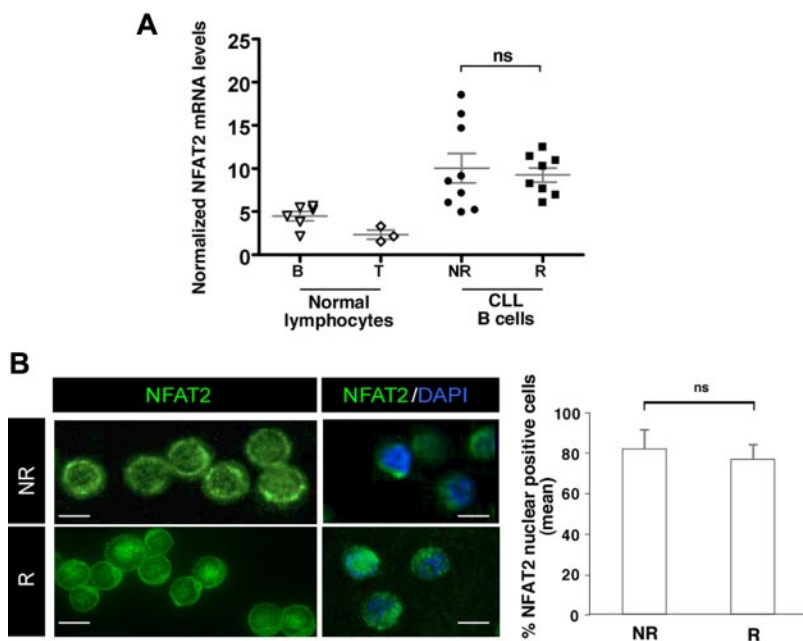
triggering for neither of them (supplemental Figure 2C). This result was confirmed by flow cytometry on a larger cohort of patients using the same anti-pY352 Syk antibody (supplemental Figure 2D). Although these results contrast with the global phosphorylation pattern of Syk, they argue for the functional implication of other conserved residues in the signaling capacity of the responding CLL B cells.

Together, these data further suggest a smallest possible requirement for membrane initiators, and early intermediates, to reach threshold levels of stimulatory signals. Cells reaching such levels only might have the capacity to respond on BCR stimulation.

#### BCR allows phosphorylation of PLC $\gamma$ 2 and calcium mobilization in responding CLL B cells

We next evaluated whether IgM-induced activation also might lead to a differential increase of PLC $\gamma$ 2 phosphorylation. Using Phos-flow cytometry analysis (as shown for 2 representative samples in Figure 2A left), anti-IgM stimulation led to considerable increase in pY759 PLC $\gamma$ 2 levels in responding cells compared with unstimulated cells but to minor extent in nonresponding cells. Mean fluorescence intensities were collected from a series of leukemic B cells, and anti-IgM-induced PLC $\gamma$ 2 phosphorylation was calculated for each sample and graphed. Results from a larger series of patients confirmed that PLC $\gamma$ 2 exhibited higher phosphorylation rates in CLL B-cell samples from the responder group compared with the nonresponder group (Figure 2A right), demonstrating that PLC $\gamma$ 2 was differentially activated between the 2 groups of patients.

To delineate the contribution of the BCR-mediated activation on Ca<sup>2+</sup> release, we next measured intracellular Ca<sup>2+</sup> uptake in both groups of patients. Anti-IgM stimulation did not lead to a significant release of calcium in nonresponding cells but led to efficient uptake of calcium in the responding cells (Figure 2B). Leukemic B cells from both groups showed increased levels of calcium in response to the ionophore ionomycin, demonstrating that the calcium pathway in nonresponding CLL B cells was not altered. Therefore, rapid PLC $\gamma$ 2 phosphorylation and calcium



**Figure 3. NFAT2 is overexpressed and to some extent localized into the nucleus of CLL B cells.** (A) Relative NFAT2 transcript levels were assessed by quantitative RT-PCR from freshly isolated normal blood peripheral B and T lymphocytes (normal lymphocytes B and T;  $n = 6$  and  $n = 3$ , respectively) and from CLL B cells from NR and R cases ( $n = 17$ ). NFAT levels were normalized to Abelson expression. (B) Freshly purified CLL B cells ( $n = 10$ ) were immunostained with anti-NFAT2 antibody. Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. One representative case of each CLL group (NR and R) is presented. Images were acquired using confocal laser-scanning microscope (TCS SP2; Leica). Scale bars represent 5  $\mu$ m. Single optical sections were obtained with high numerical aperture lens ( $63 \times 2.8$  NA) to determine the percentage of NFAT2-positive nuclei in NR and R cells and graphed on the right histogram; an average of 90 cells/sample (6 samples) were analyzed. No statistical difference was observed (ns).

uptake on BCR stimulation could serve as potential biomarkers to discriminate CLL patient groups.

#### NFAT2 is constitutively overexpressed and to some extent localizes into the nucleus of CLL B cells

Studies have shown that the BCR/PLC $\gamma$ 2-calcium signaling cascade leads to the subsequent activation of NFAT transcription factors. Although NFAT1 is predominantly expressed in resting T cells, NFAT2 is induced under the positive control of NFAT1 in response to stimulation.<sup>31,32</sup> We first evaluated by RT-PCR the transcript levels of NFAT1 and NFAT2 isoforms in CLL cells. Interestingly, both NFAT2 and NFAT1 transcript levels were higher in CLL B cells compared with normal B lymphocytes (Figure 3A and supplemental Figure 3A, respectively). NFAT1 levels in CLL B cells were comparable with those detected in T lymphocytes with even higher levels in nonresponding B cells. Despite the heterogeneous NFAT2 transcript levels in nonresponding cells compared with responding cells, quantification of mRNA amounts showed no significant difference between the 2 groups of CLL B cells.

Because NFAT2 appears as a major regulator of cell death inhibition in B cells, we focused our studies on this highly expressed factor NFAT2. Interphase and metaphase FISH analysis showed neither translocation breakpoints nor amplifications (supplemental Figure 3B), indicating that chromosomal alterations are unlikely at the origin of the higher NFAT2 mRNA levels of expression in CLL B cells.

We next determined whether NFAT2 mRNA overexpression and constitutive activation of the cells might lead to the deregulation of NFAT2 protein localization. The subcellular distribution of NFAT2 proteins in CLL B cells from both groups of patients was analyzed and compared with normal B cells using confocal microscopy. Although cytoplasmic NFAT2 only translocated into the nucleus on IgM stimulation or ionomycin treatment in normal B cells (supplemental Figure 4A), NFAT2 was detected in both the cytoplasm and the nucleus of unstimulated CLL B cells (Figure 3B left). Furthermore, quantification of NFAT2 nuclear staining on larger panels of CLL B cells showed no significant difference between nonresponder and responder patients (Figure 3B right).

Together, these data show that NFAT2 was up-regulated and partially translocated into the nucleus in unstimulated B cells from both patient groups, suggesting some constitutive activation of NFAT2 in CLL B cells.

#### On BCR ligation, NFAT2 is differentially activated in responding and nonresponding cells

NFAT2 DNA-binding capacity was investigated in responding and nonresponding cells using an ELISA-derived assay. Although DNA binding activity of nuclear NFAT2 in our patient samples was quite heterogeneous within both groups, no significant difference was observed between responding and nonresponding cells, consistent with our immunofluorescence data (Figures 4A and 3B, respectively).

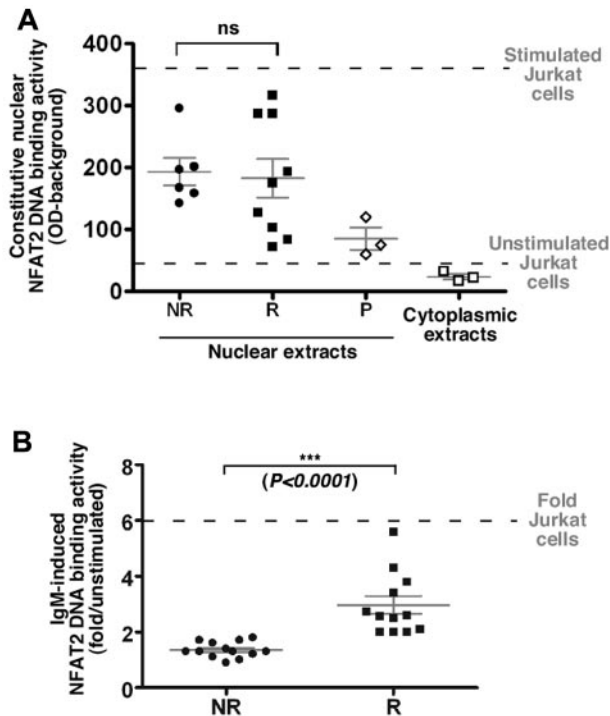
Interestingly, 12/12 responding CLL B cells showed increased NFAT2 DNA-binding activity in response to anti-IgM ligation (3.0-fold  $\pm$  0.3; Figure 4B). In contrast, elevation of NFAT DNA binding was almost negligible in 13/13 nonresponding cell extracts (1.3-fold  $\pm$  0.08) on IgM triggering.

Finally, both nonresponding and responding cells showed, with various extent, enhanced NFAT2 DNA-binding capacity on ionomycin treatment indicative of a functional pathway in both cell types (supplemental Figure 4B).

Together these data suggest that all CLL B cells might be in a preactivated stage, but BCR-mediated signaling is necessary to achieve significant transcriptional activation, as we observed in responding cells. Furthermore, our results indicate that IgM-induced NFAT2 DNA-binding activity discriminates CLL patient groups.

#### VIVIT peptide inhibitor blocks the BCR-NFAT-dependent pathway in responding CLL B cells

Given that NFAT transcription factors are translocated into the nucleus on calcineurin-dependent dephosphorylation, we tested the specific 11R-VIVIT peptide that effectively competes with NFATs for calcineurin binding.<sup>28</sup>



**Figure 4.** On BCR ligation, NFAT2 is differentially activated in B cells from both groups of patients. (A) Nuclear or cytoplasmic extracts from freshly isolated B cells from R (n = 9) and NR (n = 6) cases and from unstimulated or CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>-stimulated Jurkat cell line (horizontal dashed lines) were analyzed for their NFAT2 DNA-binding ability using an ELISA-derived assay. Competition with a specific oligonucleotide was used to ensure binding specificity (P, probe; n = 3). No statistical difference (ns) was observed between NR and R patient extracts. (B) Nuclear extracts from NR (n = 13) and R (n = 12) cells stimulated or not with an anti-IgM antibody (10  $\mu$ g/mL/10<sup>6</sup> cells) for 18 hours were used following the same protocol as described in panel A. Results are presented as fold induction of the NFAT2 DNA-binding ability on stimulation.

Treatment of the cells with VIVIT allowed immunodetection of NFAT2 in the cytoplasm only even on stimulation, verifying that nuclear translocation of NFAT2 was fully abolished (Figure 5A).

We next examined the effect of VIVIT treatment on CD23, a direct transcriptional target of NFAT, that is up-regulated on BCR stimulation in responding B cells only.<sup>6</sup> RT-PCR analysis showed that BCR triggering induced CD23 transcription in responding cells. Remarkably, cotreatment of the cells with VIVIT strongly inhibited CD23 transcription in response to BCR stimulation (Figure 5B). Indeed, flow cytometry analysis revealed that CD23 protein expression also was increased on BCR stimulation in most responding CLL B-cell samples tested (n = 7). Cotreatment with increasing concentrations of VIVIT showed a dose-dependent decrease of CD23 membrane expression (Figure 5C). The specific competitive effect of VIVIT on NFAT-dependent transcription was confirmed using expression of CD71, a NFAT-independent marker of stimulated B cells (Figure 5D).

The ability of nonresponding cells to propagate signaling downstream of NFAT activation (supplemental Figure 4B) was further confirmed by a dose-dependent induction of CD23 expression on ionomycin treatment (supplemental Figure 4C). Indeed, similar induction was observed in responding cells. Together, these data demonstrated that inhibition of the calcineurin-NFAT complex, through VIVIT treatment, abolished IgM-induced NFAT transcriptional activity.

To determine whether inhibiting calcineurin-NFAT2 pathway might affect BCR-induced survival, the metabolic activity of the

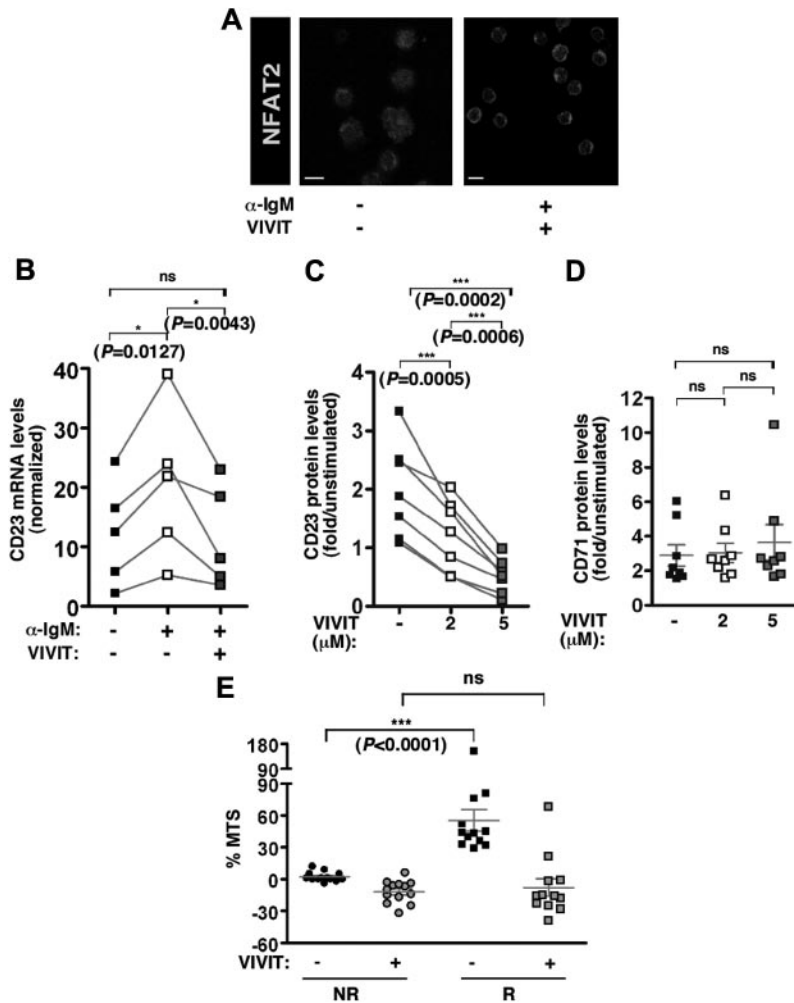
cells from both patient groups was evaluated in the presence of the VIVIT inhibitor (Figure 5E). Consistent with our previous results,<sup>6</sup> we observed a much stronger increase of the metabolic activity in responding cells (n = 12) compared with nonresponding cells (n = 13;  $P < .0001$ ). Interestingly, the almost 50% increase of the metabolic activity in responding cells was strongly repressed in the presence of the VIVIT peptide. In contrast, VIVIT treatment of the nonresponding cells led to a minor decrease in their metabolic activity, indicative of a very low toxicity effect on CLL B cells. Furthermore, VIVIT treatment in stimulated responding B cells resulted in metabolic levels comparable with those of the nonresponding B cells, indicating that VIVIT treatment can fully repress NFAT-driven activation pathway in responder cases. In addition, at the opposite of IgM stimulation, ionomycin treatment, that increased NFAT2 transcriptional activity of the nonresponding cells (supplemental Figure 4B), also resulted in a substantial enhancement of the metabolic activity (supplemental Figure 4D). Indeed, an ionomycin-driven activation of the metabolic activity also was observed in responding cells albeit to a lower extent than IgM stimulation. Overall, these results demonstrated that BCR-induced cell survival necessitates the calcium-NFAT signaling pathway and treatment with VIVIT altered the deleterious survival of the most responsive cells.

#### IgM-induced B-cell survival is relevant for CLL clinical outcome

Finally, we investigated whether the ability to discriminate between responder and nonresponder patients according to their BCR-NFAT pathway activation might be of a clinical relevance. PFS and OS were assessed for the 77 untreated patients enrolled in our study, with a median follow-up of 48.6 and 60.4 months, respectively. PFS was significantly different between the responder and nonresponder group. Although median PFS was not reached for the nonresponder group, the median PFS was 20.3 months for the responder group (Figure 6A;  $P < .0001$ , log-rank test). These results demonstrate the pathophysiologic relevance of measuring IgM-induced metabolic activity in CLL B cells. Absence of BCR signaling capacity in vitro was clearly restricted to patients with stable disease, whereas IgM-induced B-cell survival advantage was associated with disease progression. Moreover, individual assessment of the early intermediates argues for the necessity of minimal amounts of these effectors to provoke cellular activation (supplemental Table 2). Even more strikingly, overall survival analysis revealed a clear difference between both groups. Median survival in the responder group was 74.2 months, whereas it was not reached in the nonresponder group. With a median follow up of 60.4 months, only 1 patient died in the nonresponder group, and from a CLL unrelated disease (Figure 6B;  $P = .0002$ , log-rank test). Therefore, IgM-induced B-cell survival advantage represents a functional predictor of the aggressive clinical course of CLL.

## Discussion

Numerous reports, including ours, indicate an important role for BCR signaling in CLL pathogenesis and disease progression.<sup>6,7,10,33</sup> Previously, we have demonstrated that, in vitro, BCR ligation induces a survival advantage in CLL B cells isolated from patients with unfavorable prognostic factors.<sup>6</sup> Here, we demonstrate that the differential advantage observed in vitro translates into a striking difference for patient disease evolution. BCR unresponsiveness is clearly restricted to stable CLL cases, whereas BCR signaling



**Figure 5. VIVIT peptide inhibitor blocks the BCR/NFAT-dependent pathway in responding CLL B cells.** (A) NFAT2 immunofluorescence staining of CLL B cells from 1 representative R case ( $n = 3$ ) stimulated or not in the presence or not of NFAT inhibitor 11-R VIVIT ( $5\mu\text{M}$  for 24 hours). Scale bar corresponds to  $5\mu\text{m}$ . (B) Quantitative RT-PCR analysis of CD23 transcript expression levels in freshly isolated B cells from R cases ( $n = 5$ ) on stimulation with anti-IgM ( $10\mu\text{g/mL}$ ) in the presence or not of 11-R VIVIT ( $5\mu\text{M}$ ). CD23 mRNA expression was normalized on ABL transcript expression in each tested sample, and results were graphed. Cell surface expression of CD23 protein (C) or CD71 protein (D) was determined using flow cytometry analysis on CLL cells from 7 (C) or 8 (D) R cases stimulated with anti-IgM ( $10\mu\text{g/mL}$ ) in presence of increasing concentrations (0, 2, and  $5\mu\text{M}$ ) of 11-R VIVIT. Levels are indicated as fold increase on stimulation. (E) Fold increase of metabolic activity (% MTS) was determined on 48-hour BCR stimulation for 13 NR and 12 R cases. B lymphocytes were incubated in the presence or not of 11-R VIVIT ( $5\mu\text{M}$ ).

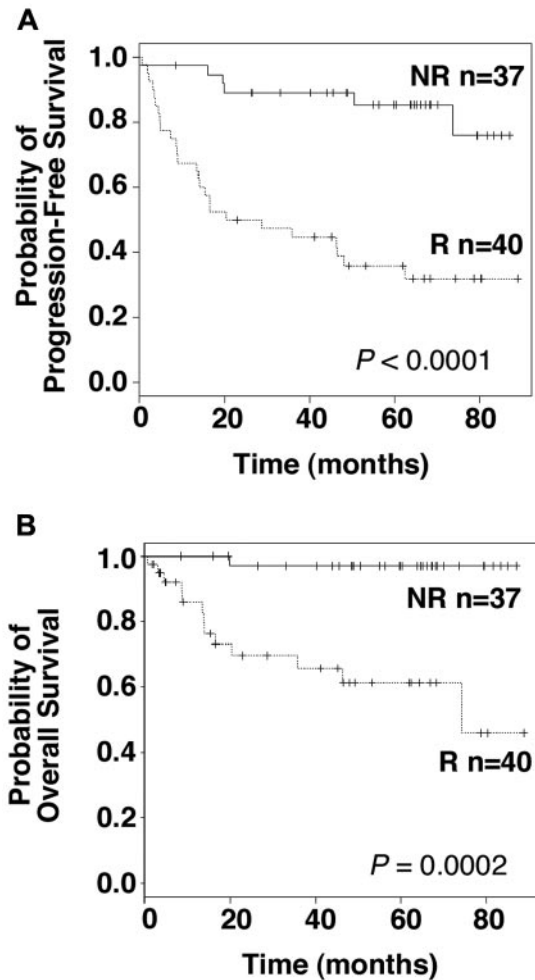
capacity is associated with disease progression, shorter PFS, and shortened OS. At present, the common prognostic parameters used in the evaluation of CLL do not allow to observe such a discriminative overall survival between the 2 groups. The potential prognostic use of this novel assessment is under investigation on a larger cohort of fully annotated CLL cases by multivariate analysis with the established prognostic markers.

Further dissection of emanating signaling pathways provides evidences for a quantitative role of the initial signalosome components in the differential survival capacity of the cells between patients experiencing unfavorable or favorable clinical outcomes. Our analysis, in line with other reports, describe deregulated expression levels for various components of the BCR signaling complex in CLL B cells compared with normal B cells. In regard to this point, it has been established that low levels of BCR is a hallmark of CLL B cells because of an incorrect folding of both IgM and CD79a.<sup>3,8,15,16</sup> However, based on the differential in vitro survival readout, B cells from the responder group express higher surface IgM levels compared with nonresponding cells. These results point out to the importance of IgM-induced signaling all along B-cell development with increasing levels required during both T1-T2 transitional stages and peritoneal differentiation.<sup>34</sup> Furthermore, higher levels of IgM altogether with unmutated IGHV might contribute to a better recognition of multivalent antigens, providing stronger survival signals and selection in favor of the pathologic clonal expansion. The difference of surface IgM observed between nonresponding and responding cells suggests

that a minimal number of receptor is necessary to reach a responsiveness threshold leading to cell survival. Absence of a significant difference for CD20 coreceptor between the 2 groups of patients is indicative of the central role held by the BCR in the threshold, and this despite the known association of this modulator with the IgM-CD79a-CD79b complex.<sup>35</sup>

Cytogenetic analysis confirmed that the transcriptional induction of *SYK* and *NFAT2* in CLL B cells was not linked to genetic alteration.<sup>30,36</sup> Deregulated expression might therefore be indicative of differential signaling activities in these cells in response to external BCR triggering. Of note, we observed higher levels of NFAT1, predominantly expressed in resting T cells, in the non-responder group that exhibits low signaling capacity and metabolic activity. Interestingly, CLL B lymphocytes from responder cases expressed, on average, higher amounts of Syk and Zap70 proteins. Our results show also that a minimal amount of Syk or Zap70 is necessary to further propagate the initial signal emanating from the BCR complex and that these protein tyrosine kinases also take part in setting up signaling thresholds. Accordingly, higher expression levels of Syk and/or Zap70 might compensate lower levels of surface IgM in responding cells. Conversely, lower levels of Syk and Zap70 hinder higher membrane levels of IgM in nonresponding cells, adding value to compensatory expression levels (supplemental Table 2).

Consistent with our previous findings, constitutive tyrosine phosphorylation of Syk is observed in CLL B cells. Furthermore, it allows for a distinction between the 2 groups of patients.<sup>6,7,18,30,37</sup> In



**Figure 6.** IgM-induced cell survival is relevant for CLL clinical outcome. Kaplan-Meier plots showing PFS (A) and OS (B) distributions in R and NR patients. Log-rank test was used to compare statistical differences in PFS and survival between both groups ( $P$  values are indicated).

accordance with its weak affinity for the BCR, the presence of Zap70 does not influence the basal phosphorylation of Syk. The differential constitutive phosphorylation of Syk may be because of the chronic exposure of the BCR to various soluble autoantigens and to the quantitative enhancement of both IgM and Syk expression in responding cells.<sup>7</sup> Our discrimination between the 2 groups of patients is further supported by an increased Syk phosphorylation on IgM stimulation in B cells from responder cases only. In both constitutive and stimulatory contexts, the absence of further phosphorylation in the presence of Zap70 rather argues for an adaptor function of Zap70 in the recruitment of downstream signaling effectors.<sup>7,24,37,38</sup> Therefore, we show that, in addition to BCR levels and structure, levels and activation of several downstream intermediates are also essential for the differential activation of the cells.

Given the stepwise activation of Syk and the alternative presence of Zap70, we also delineated the global activation status of the cells through the analysis of PLC $\gamma$ 2 activation and calcium flux.<sup>17,26,39,40</sup> Differential activation was observed for both of these targets between responding and nonresponding CLL B cells. Furthermore, analysis of pY759 PLC $\gamma$ 2 seems to be a more reliable activation marker than other intermediates and kinases, including Syk/Zap70, Src family kinases (such as Lyn), or Btk, whose levels are all highly variable in CLL cells. Therefore, IgM-dependent

PLC $\gamma$ 2 Y759 phosphorylation may serve as a potential biomarker of evolutivity in CLL and may be used as readout of the efficacy of Syk or Btk inhibitors. It is also tempting to speculate that specific PLC $\gamma$ 2 inhibitors might be developed.

Together, our study shows that the survival advantage of responding cells is the result of a balanced expression of early intermediates that establish a threshold for a cellular response. Once this threshold is reached, cells become responsive and maximize their signaling capacity by up-regulating intracellular effectors imposing a pressure for expansion through self-activation.

In terms of downstream signaling pathways, sustained engagement of the BCR results in significantly prolonged activation of Akt and ERK kinases and enhanced degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B.<sup>12</sup> BCR engagement induces activation of transcription factors, such as NFATs, that are major effectors of long-term biologic responses in B lymphocytes, including proliferation, survival, and differentiation.<sup>41</sup> Our studies demonstrated that NFAT2 overexpression in unstimulated CLL B cells is associated with increased nuclear localization and transcriptional activity, responses that are not observed in unstimulated normal peripheral B lymphocytes. The weak constitutive NFAT2 DNA-binding activity observed in all CLL B cells might be indicative of the continuous exposure of the leukemic cells to antigens, leading to some anergic phenotype.<sup>42</sup> These properties, together with a restricted BCR repertoire, CD5 expression, active signal transducer and activator of transcription 3, and natural IgM antibodies production are shared between CLL and murine B1a cells.<sup>1,2,7,8,30,42,43</sup> In mice, NFAT2 genetic inactivation dramatically affects the B1a cellular compartment, whereas NFAT2 overexpression in NFAT2<sup>-/-</sup> B cells partially rescues the development and survival of these cells.<sup>43</sup> We demonstrated that NFAT2 DNA-binding activity is induced on IgM ligation in CLL B cells from the responder group only. Thus, the active IgM-dependent signaling might allow for bypassing the anergic process in this group, but nonresponding cells could not overcome threshold levels. Accordingly, ionomycin treatment that shunts upstream molecular intermediates of the BCR signaling pathway restores induction of NFAT2 DNA-binding in nonresponding cells. However, the global lower responsiveness of these cells also argues for the requirement of upstream BCR signaling to bypass the anergic process.

To demonstrate the functional implication of NFAT2 as a biomarker in CLL B cells, we used the NFAT-specific inhibitor 11R-VIVIT, shown to be more selective than cyclosporin A and FK506, and a biomarker that can actively compete for calcineurin binding to block NFAT dephosphorylation.<sup>28</sup> VIVIT robustly blocked nuclear translocation of NFAT on stimulation in responding CLL B cells. Remarkably, trapping NFAT2 into the cytoplasm by VIVIT treatment resulted in a clear effect on cell survival in responding CLL B cells. Inhibition of NFAT nuclear translocation led responding CLL B cells to resemble nonresponding cells. Conversely, translocation of NFAT via ionomycin treatment induced nonresponding cells to resemble responding cells. These results demonstrate the essential role of NFAT in maintaining the cell-fate balance of these cells. Consistent with the role of NFATs as transcriptional regulators, VIVIT treatment blocked the expression of CD23, a direct transcriptional target of NFAT2. Interestingly, membrane CD23 has been targeted for antibody therapy in CLL disease. This type of treatment leads to B-cell apoptosis, further supporting a role for CD23 in CLL B-cell survival.<sup>44</sup> The self-activating loop of the responding CLL B cells might therefore be a powerful target for therapy in patients who present a

progressive profile. This potential therapeutic avenue should be further investigated.

We demonstrate that nonresponding and responding CLL B cells exhibit differential signaling responses downstream of the BCR, in terms of IgM-induced global Syk phosphorylation, PLC $\gamma$ 2 activation, calcium release, and NFAT2 transcriptional activity. In addition, our study supports the usefulness of these various intermediates as more practical functional markers of B cells from CLL patients who have an unfavorable clinical course. In terms of therapeutic options, several intermediates of the signaling cascade might be promising targets for disease treatment. For example, the NFAT inhibitor peptide VIVIT, which does not compromise non-NFAT-mediated calcineurin signaling, abolishes cell survival response specifically generated downstream of BCR ligation.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr R. Balderas (BD Biosciences, US), J. F. Mathieu and F. Navarro (BD Biosciences, Europe) for providing flow cytometry reagents and antibodies directed against Syk and PLC $\gamma$ 2 proteins and their phosphorylated forms. BAC clones RP11-91C19 and RP11-803N2 were kindly provided by Dr S. Romana (Equipe Mixte Inserm 0210, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France). They acknowledge S. Saint Georges for assistance in sample preparation and Dr L. Izzi (Montréal, QC) for critical reading of the manuscript.

## References

- Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood*. 1991;78(8):1901-1914.
- Caligaris-Cappio F, Ferrarini M. B cells and their fate in health and disease. *Immunol Today*. 1996;17(5):206-208.
- Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev*. 1997;11(3):119-128.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-815.
- Letestu R, Levy V, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588-4590.
- Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. 2006;66(14):7158-7166.
- Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev*. 2007;7(2):102-108.
- Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(7):405-418.
- Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, et al. Downregulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res*. 2009;69(16):6387-6395.
- Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103(12):4389-4395.
- Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood*. 2002;100(10):3741-3748.
- Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;105(12):4820-4827.
- 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(2):846-855.
- Monroe JGITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):283-294.
- Lankester AC, van Schijndel GM, van der Schoot CE, van Oers MH, van Noesel CJ, van Lier RA. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1995;86(3):1090-1097.
- Vuillier F, Dumas G, Magnac C, et al. Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood*. 2005;105(7):2933-2940.
- Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):387-402.
- Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene*. 2009;28(37):3261-3273.
- Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009;23(4):686-697.
- Carsetti L, Laurenti L, Gobessi S, Longo PG, Leone G, Efremov DG. Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation. *Cell Signal*. 2009;21(7):1187-1194.
- Suljagic M, Longo PG, Bannardo S, et al. The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the Emu-TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood*. 2010;116(23):4894-4905.
- Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578-2585.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-1775.
- Chen L, Huynh L, Apgar J, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2685-2692.
- Hong JJ, Yankee TM, Harrison ML, Geahlen RL. Regulation of signaling in B cells through the phosphorylation of Syk on linker region tyrosines. A mechanism for negative signaling by the Lyn tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2002;277(35):31703-31714.
- Song Z, Lu P, Furman RR, et al. Activities of SYK and PLCgamma2 predict apoptotic response of CLL cells to SRC tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):587-599.
- Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 2002;109 Suppl:S67-S79.
- Müller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(9):645-656.
- Schuh K, Avots A, Tony HP, Serfling E, Kneitz C.

## Authorship

Contribution: C.L.R., P.-A.D., N.C., T.B., and M.Q. performed the experiments and analyzed the data; V.E. performed FISH experiments; R.L. shared expertise in flow cytometry experiments; C.L.R. and P.-A.D. designed the figures and wrote the manuscript with F.A.-C. and N.V.-B; V.L. and F.A.-C. provided patient samples with biologic criteria; and M.B. and V.L. performed statistical analysis.

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

Correspondence: Nadine Varin-Blank, UMR 978 Inserm-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; e-mail: nadine.varin@inserm.fr; or Florence Ajchenbaum-Cymbalista, Laboratoire d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, 125 rue de Stalingrad, 93009 Bobigny Cedex, France; e-mail: florence.cymbalista@avc.aphp.fr.

- Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk Lymphoma*. 1996;23(5-6):583-592.
30. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2009;69(13):5424-5432.
  31. Zhou B, Cron RQ, Wu B, et al. Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2. *J Biol Chem*. 2002;277(12):10704-10711.
  32. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrstin D, et al. Auto-regulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity*. 2002;16(6):881-895.
  33. Ferrarini M, Chiorazzi N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. 2004; 41(3):207-223.
  34. Su TT, Guo B, Wei B, Braun J, Rawlings DJ. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev*. 2004;197:161-178.
  35. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18545-18552.
  36. Philippen A, Diener S, Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S, Mertens D. SYK carries no activating point mutations in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol*. 2010;150(5):633-636.
  37. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036-2041.
  38. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 2007; 109(5):2032-2039.
  39. Watanabe D, Hashimoto S, Ishiai M, et al. Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J Biol Chem*. 2001; 276(42):38595-38601.
  40. Kim YJ, Sekiya F, Poulin B, Bae YS, Rhee SG. Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma2. *Mol Cell Biol*. 2004;24(22):9986-9999.
  41. Antony P, Petro JB, Carlesso G, Shinnars NP, Lowe J, Khan WN. B-cell antigen receptor activates transcription factors NFAT (nuclear factor of activated T-cells) and NF-kappaB (nuclear factor kappaB) via a mechanism that involves diacylglycerol. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(1):113-115.
  42. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112(1):188-195.
  43. Berland R, Wortis HH. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13459-13464.
  44. Pathan NI, Chu P, Hariharan K, Cheney C, Molina A, Byrd J. Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines. *Blood*. 2008;111(3):1594-1602.





**blood**

2012 120: 356-365  
doi:10.1182/blood-2011-12-397158 originally published  
online May 21, 2012

## **The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia**

Christine Le Roy, Pierre-Antoine Deglesne, Nathalie Chevallier, Taoufik Beitar, Virginie Eclache, Maude Quettier, Marouane Boubaya, Rémi Letestu, Vincent Lévy, Florence Ajchenbaum-Cymbalista and Nadine Varin-Blank

---

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/120/2/356.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Lymphoid Neoplasia](#) (1895 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>



## SUPPLEMENTAL DATA

### SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

#### ELISA for NFAT2 DNA binding activity

Briefly, proteins were extracted separately from cytoplasmic and nuclear fractions using Nuclear Extract kit and protein concentrations were measured using Bradford protein assay (Bio-Rad). Two micrograms of either nuclear or cytoplasmic extracts were added to individual wells in a 96-well plate previously coated with oligonucleotides presenting the consensus NFAT DNA-binding site (5'-AGGAAA-3'). The presence of NFAT2 was revealed upon incubation with specific anti-NFAT2 antibody followed by secondary HRP-conjugated antibody and standard colorimetric detection using ELISA reader ( $\lambda=450$  nm).

#### RT-PCR

The following cycles were applied using a 7000 SDS Thermal Cycler (Applied Biosystems): denaturation for 20 sec at 95°C, followed by 40 cycles of 3 sec at 95°C and 30 sec at 60°C, and a cycle of 15 sec at 95°C, 1 min at 60°C, 15 sec at 95°C and 15 sec at 60°C. Primers (Sigma) used were: (sense S; antisense AS): NFAT1 (NFATC2) S 5'-TgCATCTAACCCCATCgAgTg-3'; AS 5'-AAAgtTCTgCCCCgTgAggAT-3'; NFAT2 (NFATC1) S 5'-TgCaggACTCCAaggTCATTT-3'; AS 5'-CAgAgAATTCggCTTgCACA-3'; Hs ABL S 5'-TggAgATAACACTCTAAGCATAACTAAAggT-3'; AS 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'; CD23a S 5'-GCCATGGAGGAAGGTCAATATT-3'; AS 5'-ACAGGAGAAGCAGAGTCAGCAG-3'

### **Fluorescent *in situ* hybridization**

For the detection of putative chromosomal alterations affecting the *NFATc1*-locus on chromosome 18q23, BAC clones RP11-91C19 and RP11-803N2 were used. Similarly for the detection of *SYK* alterations on chromosome 9q22.31: BAC clones RP1183L6 and RP11-61N16 (BlueGnome) combined with a D9Z1 probe (Abbott) were used. FISH was performed on stored cytogenetic specimens harvested after stimulation with PMA (Sigma) and Interleukin 2 (Roche), according to described procedures (Eclache et al., 2004). Metaphases were analyzed with at least 200 nuclei scored using a Zeiss Axiophot II fluorescent microscope (camera CCD, Jai) linked to MetaSystems software.

**SUPPLEMENTAL TABLES AND FIGURE LEGENDS**

**Supplemental Table 1: Characteristics of the 77 CLL patients (#UPN)<sup>1</sup>**

UPN#	MTS <sup>*</sup>	M/UM <sup>†</sup>	Zap70 <sup>‡</sup>	UPN#	MTS <sup>*</sup>	M/UM <sup>†</sup>	Zap70 <sup>‡</sup>
1	NR	M	-	41	R	M	-
2	NR	M	-	46	R	M	-
3	NR	M	-	50	R	M	-
4	NR	M	-	51	R	M	-
7	NR	M	-	55	R	M	-
8	NR	M	-	56	R	M	-
9	NR	M	-	58	R	M	-
10	NR	M	-	63	R	M	-
12	NR	M	-	65	R	M	-
13	NR	M	-	67	R	M	-
16	NR	M	-	68	R	M	-
18	NR	M	-	70	R	M	-
20	NR	M	-	72	R	M	-
21	NR	M	-	75	R	M	-
22	NR	M	-	43	R	M	+
24	NR	M	-	47	R	M	+
25	NR	M	-	59	R	M	+
26	NR	M	-	64	R	UM	-
28	NR	M	-	38	R	UM	+
29	NR	M	-	39	R	UM	+
35	NR	M	-	40	R	UM	+
37	NR	M	-	42	R	UM	+
11	NR	M	+	44	R	UM	+
30	NR	M	+	45	R	UM	+
31	NR	M	+	48	R	UM	+
5	NR	UM	-	52	R	UM	+
17	NR	UM	-	53	R	UM	+
27	NR	UM	-	54	R	UM	+
33	NR	UM	-	57	R	UM	+
36	NR	UM	-	60	R	UM	+
6	NR	UM	+	62	R	UM	+
14	NR	UM	+	66	R	UM	+
15	NR	UM	+	69	R	UM	+
19	NR	UM	+	71	R	UM	+
23	NR	UM	+	73	R	UM	+
32	NR	UM	+	74	R	UM	+
34	NR	UM	+	76	R	UM	+
				77	R	UM	+
				49	R	UM	ND
				61	R	UM	ND

<sup>1</sup> Abbreviations: ND, not determined

\* *In vitro* BCR-induced cell survival signal. Increased metabolic activity < 25% and ≥ 25% allows the distinction between non responder (NR) and responder (R) cases, respectively (Deglesne et al., 2006; Vlad et al., 2009).

† IGHV mutational status. Mutated (M) and Unmutated cases (UM) are defined based on percentage homology to the closest germ line VH gene (M < 98% and UM ≥ 98%).

‡ Presence (+) or absence (-) of Zap70 proteins verified by flow cytometry (Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, biological annotations).

**Supplemental Table 2: Responsiveness threshold is due to IgM, Syk and Zap70 expression levels.**

UPN#	MTS*	IgM <sup>†</sup>	Syk <sup>‡</sup>	p-Syk <sup>§</sup>	Zap70 <sup>  </sup>	p-PLCγ2 <sup>¶</sup>
5	NR	0.27	3.85	0.8	1.32	1.08
25	NR	0.74	2.98	1	2.06	1.05
50	R	1.37	<b>24.4</b>	<b>1.3</b>	1.1	<b>1.44</b>
17	NR	2.47	2.04	1.1	0.87	1.14
45	R	3.81	<b>3.39</b>	<b>1.7</b>	<b>4.94</b>	<b>1.43</b>
30	NR	4.04	0.26	1.1	0.53	1.18
53	R	4.33	<b>2.95</b>	<b>1.4</b>	<b>8.74</b>	<b>1.49</b>
36	NR	4.66	3.3	0.9	0.12	1.13
39	R	5.69	<b>5.65</b>	<b>1.5</b>	<b>5.77</b>	<b>1.52</b>
29	NR	7.4	0.43	1.3	0.8	1.21
38	R	10.99	<b>5.46</b>	<b>1.3</b>	<b>4.95</b>	<b>2.04</b>

\* *In vitro* BCR-induced cell survival signal; non responder (NR) and responder (R) cases respectively (Deglesne et al., 2006; Vlad et al., 2009)

† Relative membrane IgM values (MFI fold increase/isotypic control) obtained by flow cytometry

‡ Syk protein levels (fold relative to normal B cells) calculated from flow cytometry analysis

§ Global phospho-tyrosine Syk; fold increase calculated as a ratio between IgM-stimulated and unstimulated levels from western blot analysis.

|| Zap70 protein levels (fold relative to normal B cells) calculated from flow cytometry analysis.

¶ IgM-induced phospho-Y<sup>759</sup> PLCγ2 (fold / unstimulated) calculated from phosflow analysis.

**Supplemental Figure 1. Membrane IgM, but not CD20 co-receptor, show higher levels of expression in responding CLL B cells.** Histogram plots from control and CLL B cells of representative non-responder (NR) or responder (R) cases after analysis of membrane protein expression by flow cytometry. (A) Control and CLL B cells were labeled with isotype antibody (top panels) or with anti-IgM antibody (bottom panels) conjugated to PE fluorochrome. (B) Control (top panel) and CLL B (middle and bottom panels) cells were labeled with anti-CD20 antibody coupled to APC-Cy7 dye.

**Supplemental Figure 2. Syk protein overexpression is not due to genetic amplification and its phosphorylation on Y<sup>352</sup> residue is not differentially regulated upon IgM-stimulation between NR and R CLL B cells.** (A) Histograms depicting Syk fluorescence intensities in normal and CLL B cell samples from one representative case for each group after flow cytometry analysis. (B) Representative FISH analysis of *SYK* gene. Two bacterial artificial chromosomes targeting the *SYK* gene and chromosome 9 satellite were used on CLL B cells from non-responder and responder patients (n=6). Panels show interphasic and metaphasic chromosomes of two representative CLL cases (2 *SYK* probes, left UPN#30 and 1 *SYK* plus 1 chromosome 9 satellite, right UPN#74). Scale bar represents 5  $\mu$ m. (C and D) Upon anti-IgM triggering, pY<sup>352</sup>Syk levels were analyzed for non-responding and responding B cells by immunoblotting (C) and flow cytometry (NR n=22, R n=24) (D). Immunoblot was revealed with the indicated antibodies and the diagram shows pY<sup>352</sup>Syk fold induction upon stimulation in NR and R CLL cases (ns, no statistical significance).

**Supplemental Figure 3. NFAT overexpression is not due to amplification in B cells from both CLL patient groups.** (A) NFAT1 transcripts were quantified by RT-PCR from freshly isolated normal blood peripheral B and T lymphocytes (Normal Lymphocytes B and T; n=6 and n=3, respectively) and from CLL B cells from non-responder and responder cases (NR and R; n=17; p=0.036). NFAT levels were normalized to Abelson transcript expression. (B) One representative FISH analysis using bacterial artificial chromosomes targeting the region 18q23 (in red and in green) on metaphasic chromosomes of B cells from each CLL group (left panel, non-responder, UPN#30 and right panel, responder, UPN#69). Scale bar indicates a 5  $\mu$ m length.

**Supplemental Figure 4. Ionomycin and BCR stimulations induce both NFAT2 nuclear localization and differential activation in CLL B cells.** (A) NFAT2 sub-cellular localization was determined in normal peripheral B cells left unstimulated (Resting), treated with ionomycin (+ Iono, n=3) or stimulated with anti-IgM for 24 hrs (+ anti-IgM, n=3). Images are issued from single section confocal microscopy. Scale bar represents a length of 5  $\mu$ m. (B) Nuclear extracts from non-responding (NR n=7) and responding (R n=4) cells treated (+) or not (-) with ionomycin (iono; 2  $\mu$ M) or stimulated (+) or not (-) with an anti-IgM antibody (10  $\mu$ g/ml/ $10^6$  cells) for 18 hrs were processed as described in the legend of Figure 4. Results are presented as fold induction of the NFAT2 DNA-binding ability upon treatment or stimulation. (C) Membrane expression of CD23 protein was determined using flow cytometry analysis on CLL cells from 8 non-responder and 2 responder cases stimulated in the presence of various concentrations (5, 2 and 1  $\mu$ M) of ionomycin or with anti-IgM (10  $\mu$ g/ml). (D) Fold increase of metabolic activity (%MTS) was determined upon 48 h–ionomycin treatment (2  $\mu$ M) or anti-IgM stimulation (10  $\mu$ g/ml) for 7 non-responder (NR) and 3 responder cases (R).

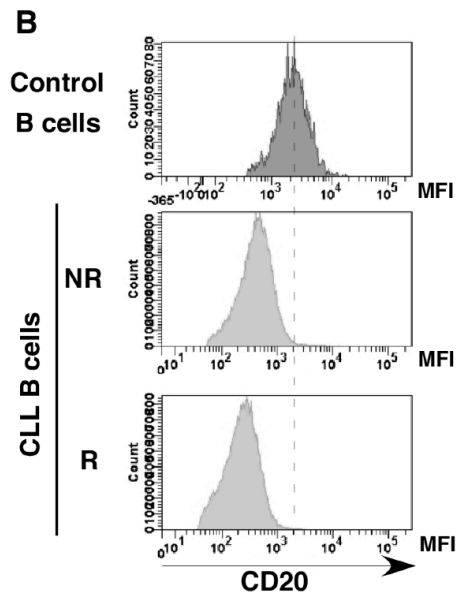
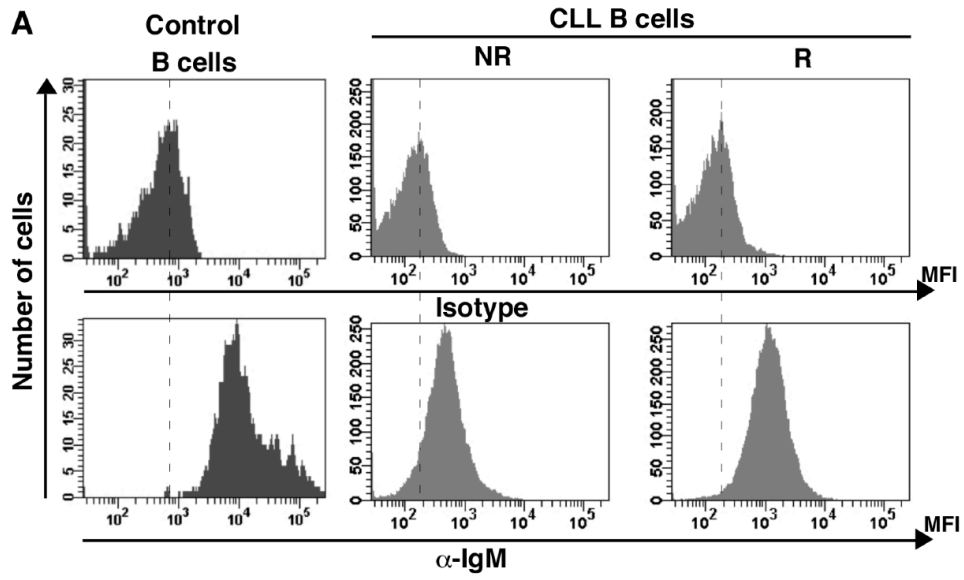


## References

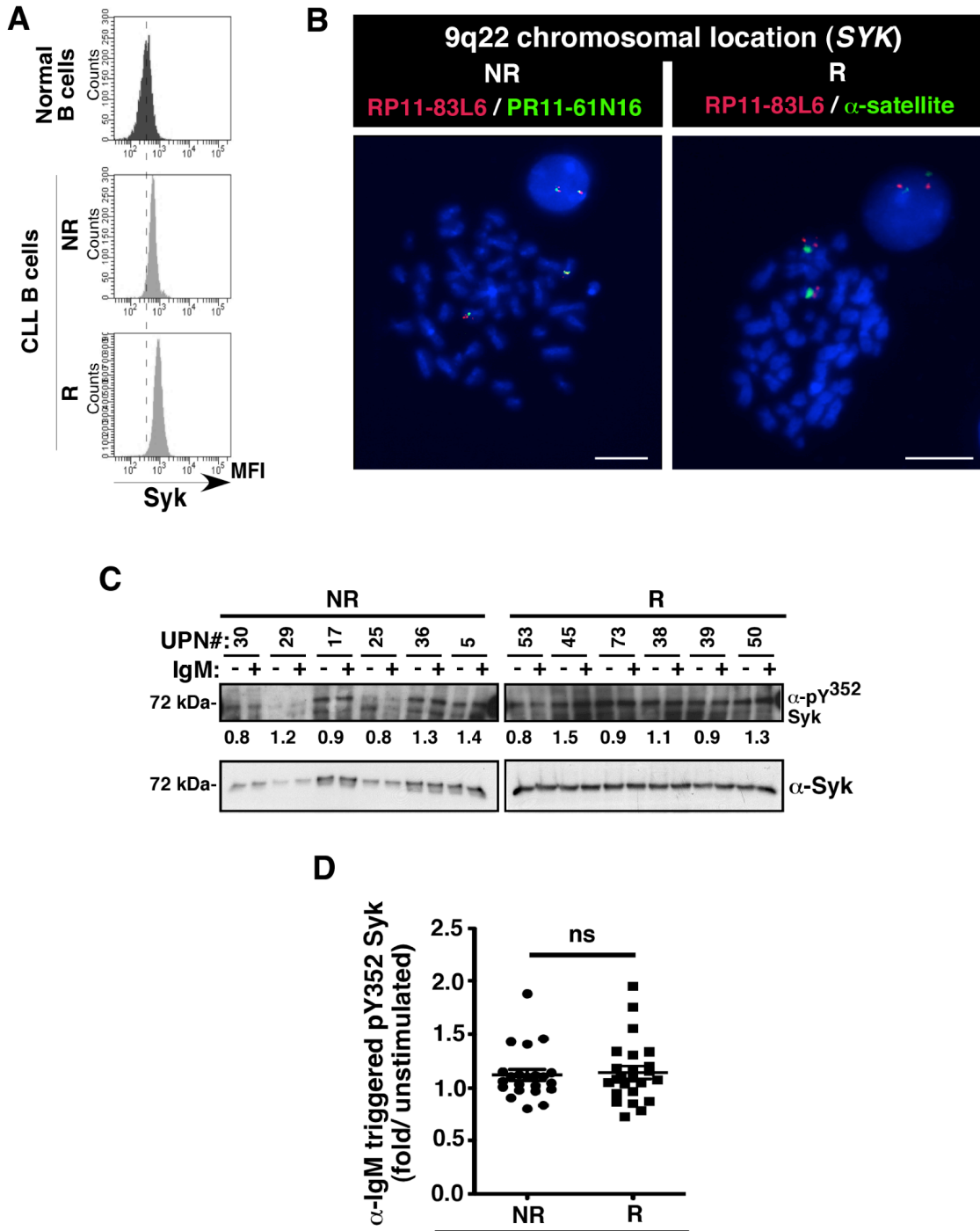
Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* 2006;66(14):7158-7166.

Eclache V, Caulet-Maugendre S, Poirel HA, et al. Cryptic deletion involving the ATM locus at 11q22.3 approximately q23.1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;152(1):72-76.

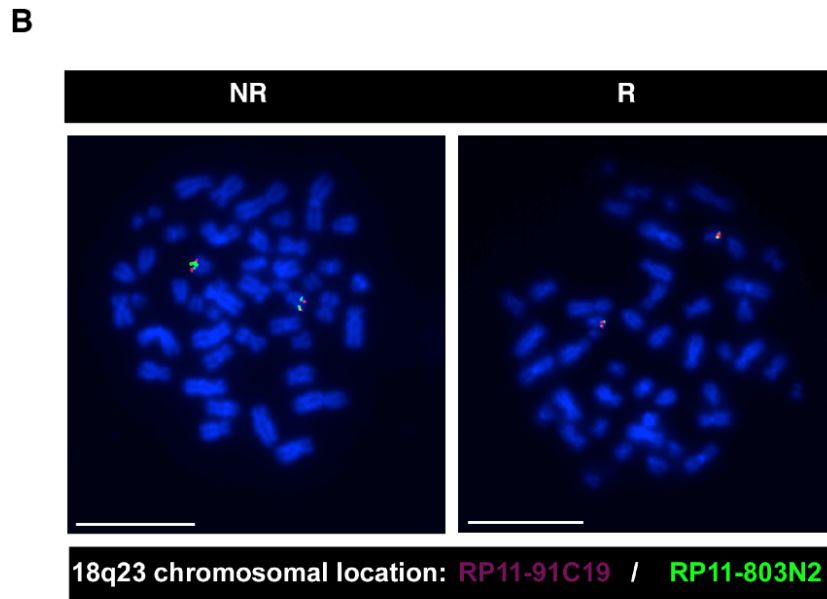
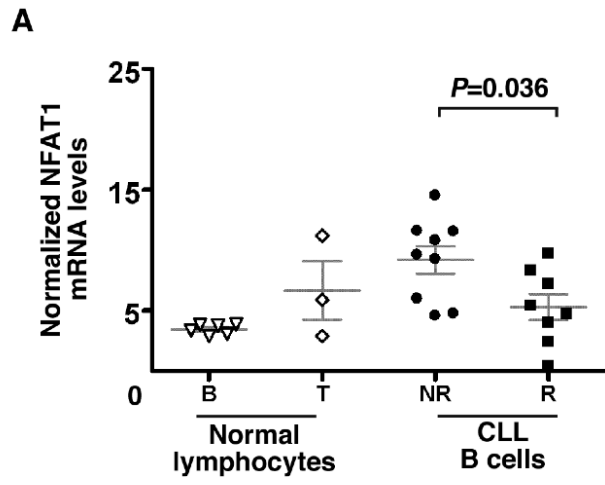
Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res.* 2009;69(16):6387-6395.



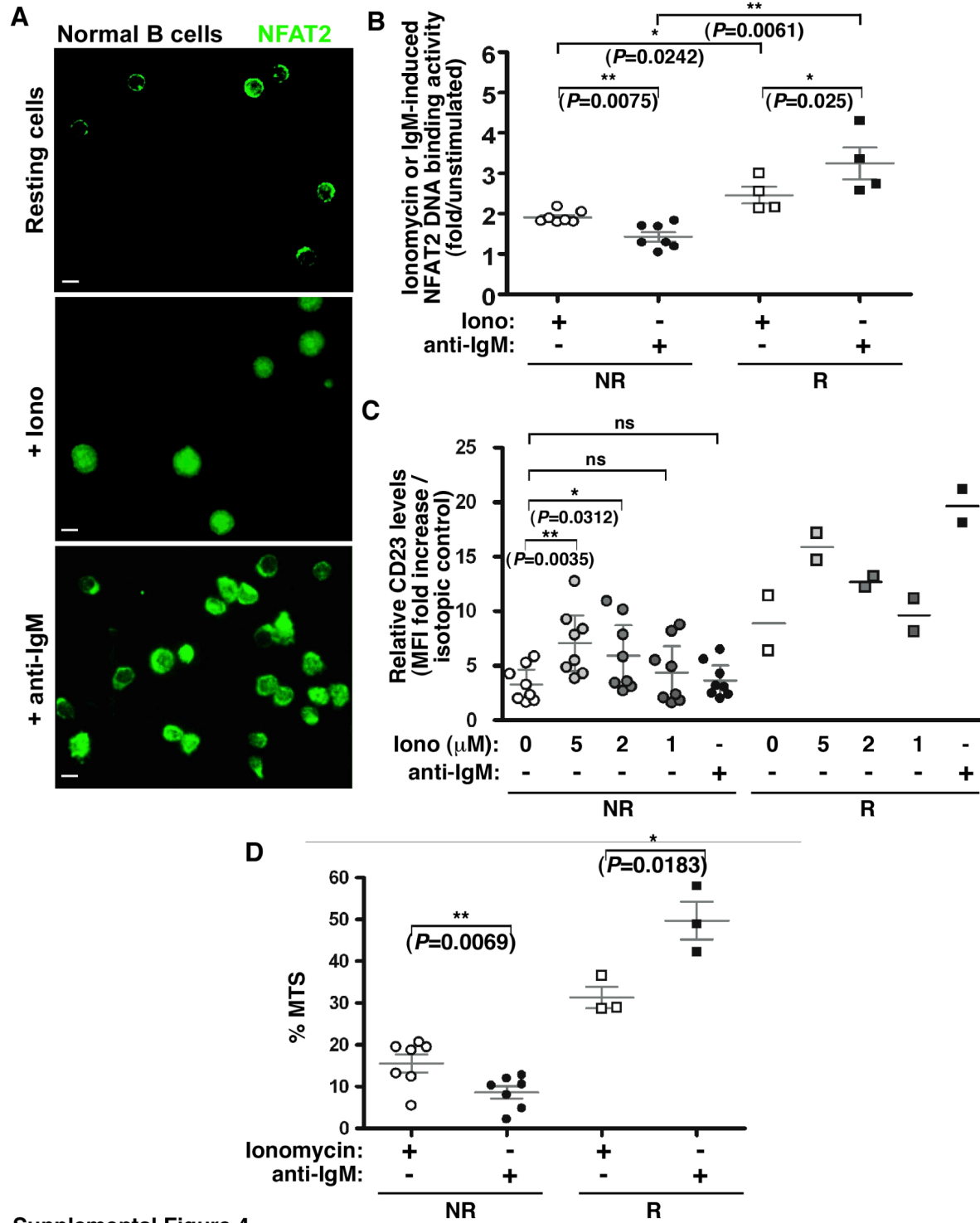
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



## **MANUSCRIT 2 : Implication fonctionnelle de Syk dans la survie des cellules B de la Leucémie Lymphoïde Chronique en réponse à une stimulation antigénique**

Dans l'objectif d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la formation du signalosome précoce, impliqué dans la survie des cellules de LLC en réponse à une stimulation du BCR, je me suis attachée à l'étude de l'activation et des partenaires d'interaction de la kinase Syk. En effet, nos travaux récemment publiés [294] démontrent que l'avantage de survie des cellules répondeuses (R) est dépendant non seulement d'un seuil d'expression de différents effecteurs précoces, avec notamment celui de Syk, mais également de la capacité de réponse à un engagement du BCR des cellules, impliquant particulièrement le niveau de phosphorylation de Syk. Cependant, les profils de phosphorylation de Syk qui reflètent son statut d'activation, ainsi que la capacité d'interaction de Syk à former des interactomes fonctionnels dans la survie des cellules B de LLC, restaient à être définis.

Des échantillons de sang frais ont été obtenus par le laboratoire d'Hématologie Biologique (Pr. F. Cymbalista, Hôpital Avicenne) et l'Unité de Recherche Clinique (URC, Pr. V. Lévy, Hôpital Avicenne), après consentement éclairé des patients. Une mesure de l'activité métabolique (% MTS) des cellules leucémiques stimulées avec un anti-IgM a permis de distinguer les cellules répondeuses R et les cellules non-répondeuses NR, ainsi que de quantifier l'inhibition de Syk lors du traitement des NR et R avec le R406. Les niveaux d'expression et de phosphorylation de Syk dans les cellules B normales et LLC ont été mesurés par une approche d'immuno-précipitation suivie d'une détection par western blot. La même approche a permis d'identifier des partenaires de Syk dans les cellules B-LLC. La localisation subcellulaire de Syk et de ses formes phosphorylées, ainsi que de ses partenaires, a été déterminée après séparation des fractions cytoplasmique et membranaire des cellules B de LLC. L'impact fonctionnel des complexes Syk a été déterminé par phosflow en mesurant l'activation de la PLC $\gamma$ 2 dans des cellules B de LLC soumises à une cinétique de stimulation antigénique en présence ou non de l'inhibiteur de Syk, le R406.

Sur la base de la survie différentielle mesurée en réponse à une stimulation antigénique, nos résultats montrent que seules les cellules B répondeuses et stimulées présentent une augmentation du niveau de phosphorylation globale sur les résidus tyrosines de Syk. Cette augmentation est

associée à une localisation membranaire de phospho-Syk dans les cellules R. Malgré l'absence d'augmentation de la phosphorylation de résidus considérés pour refléter une hausse de l'activité enzymatique, Syk est phosphorylée sur des résidus impliqués dans son changement de conformation vers une forme active et sur des résidus permettant l'ancrage de divers effecteurs. En effet, nos données révèlent que seules les cellules R montrent une association de Syk avec des effecteurs positifs (BLNK, Btk et PLC $\gamma$ 2) et négatifs (c-Cbl et Shp-1) induite au cours de la stimulation antigénique. Ainsi, cette plus grande capacité de phosphorylation et d'interaction de Syk dans les cellules R stimulées participerait à l'établissement d'un seuil d'activation permettant leur survie. Cette hypothèse a été vérifiée par le blocage de l'activité de Syk grâce à l'utilisation de l'inhibiteur R406. Nos résultats démontrent l'impact fonctionnel de Syk sur l'activation de l'effecteur PLC $\gamma$ 2 et sur l'avantage de survie des cellules R stimulées.

Ces travaux font l'objet d'un manuscrit en cours de finalisation dont je suis le premier auteur. Ils permettent de mieux comprendre comment les capacités de phosphorylation et d'interaction différentielles de Syk participent à la physiopathologie de la LLC. Ils montrent pour la première fois que Syk est capable de s'associer à des régulateurs positifs (BLNK, Btk et PLC $\gamma$ 2) et négatifs (c-Cbl et Shp-1) dans les cellules B-LLC dont la survie *in vitro* est augmentée suite à une stimulation antigénique. L'ensemble de ces travaux pourrait expliquer certains mécanisme d'action du FosD (prodrogue du R406) utilisé dans le traitement des patients LLC qui évoluent. Un des mécanismes passerait par une inhibition de la formation des signalosomes autour de Syk impliqués dans la survie cellulaire, expliquant sa meilleure efficacité *in vitro* dans les cellules de patients les plus progressifs [257].



## **BCR-driven interactomic capacity of Syk and Chronic Lymphocytic Leukemia cell survival**

Maude Quettier<sup>1,2</sup>, Stéphanie Le Coquil<sup>1,2</sup>, Lionel Guittat<sup>1,2</sup>, Vincent Lévy<sup>3</sup>, Florence Ajchenbaum-Cymbalista<sup>1,2,4</sup>, Nadine Varin-Blank<sup>1,2,†</sup> and Christine Le Roy<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>INSERM U978, Bobigny, France

<sup>2</sup>Sorbonne Paris Cité, Université Paris 13, Labex “Inflamex”, UFR SMBH, Bobigny, France

<sup>3</sup>Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Recherche Clinique, Bobigny, France

<sup>4</sup>Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d’Hématologie Biologique, Bobigny, France

† NVB and CLR are co-corresponding authors

Dr. Nadine Varin-Blank: UMR 978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 88 51; Fax: 33 1 48 38 73 69; E-mail: [nadine.varin@inserm.fr](mailto:nadine.varin@inserm.fr)

Dr. Christine Le Roy: UMR 978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 73 90; Fax: 33 1 48 38 73 69; E-mail: [christine.le-roy@inserm.fr](mailto:christine.le-roy@inserm.fr)

Running title: **Differential Syk signaling capacities in CLL cells**

Keywords: **CLL, B Cell Receptor, Syk, phosphorylation, interactome, survival**

Financial supports: **INSERM, Université Paris 13, Labex Inflamex n°ANR11 IDEX00502, Ligue Nationale Contre le Cancer.**

Disclosure and Conflicts of Interests: **There are no conflicts of interest to declare by any of the authors.**

**Abstract:**

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) carries a variable clinical course with stable and progressive patients. We previously demonstrated that *ex-vivo* B Cell Receptor (BCR) stimulation of CLL cells allowed the discrimination of non-responder from responder cases in terms of cell survival, which was correlated to differential patients' overall survival. The associated differential overexpression of Syk, a key kinase involved in BCR signal transduction, suggested that Syk contributed to CLL progression. However, the dynamic molecular composition of the BCR signalosome that involved Syk in CLL B cells was still unclear. In this work, we showed that Syk global tyrosine phosphorylation displayed different patterns between non-responder and responder samples. In responding cells, higher BCR-mediated tyrosine phosphorylated Syk was associated with its presence in membrane fraction suggesting that Syk was activated at the cell surface. Differential analysis of Syk specific phospho-tyrosine levels upon antigenic stimulation revealed that the residue Y<sup>352</sup> was phosphorylated whereas no phospho-Y<sup>525</sup> enhancement was detected upon BCR stimulation in both CLL samples. In contrast to the non-responding cells, our experiments showed an increase of BCR-mediated phospho-Y<sup>323</sup> Syk levels in responding B cells. Moreover, analysis of the composition of BCR-dependent signalosomes demonstrated that Syk associated specifically with numerous endogenous proteins including positive and negative effectors in stimulated responding CLL B cells only. Furthermore, evaluation of the functional activity of these Syk complexes on PLC $\gamma$ 2 activation during BCR stimulation, showed enhanced activation of PLC $\gamma$ 2 in responding cells that was blocked in presence of the R406 Syk inhibitor. Finally, this inhibitor impeded cell survival advantage from the responding cases. Altogether, these molecular mechanisms might be part of the differential BCR-induced survival CLL B cells and could explain how Syk contributes to CLL progression.

## **Introduction:**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most prevalent adult leukemia in Western countries. This disease is characterized by an accumulation of CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> lymphocytes in the blood, lymph nodes and bone marrow. With a highly variable natural clinical course, CLL patients presenting early and stable forms of the disease are usually free of treatment whereas patients developing a progressive form require one. In this context, a better understanding of the biology and prognosis of CLL leads to emergence of a number of BCR (B cell receptor) protein kinases as rational sites to target the complex network of signaling pathways activated after BCR stimulation. Despite encouraging results in preclinical and clinical studies, the molecular mechanisms of the developed drugs are not fully elucidated.

One BCR-proximal kinase is the Spleen tyrosine kinase (Syk) that provides catalytic activity to hematopoietic cell surface receptors encompassing ITAMs in their signaling subunits and controls multiple physiological functions in B lymphocytes (Mocsai, Ruland et al. 2010). Syk contains a tandem pair of SH2 (Src homology 2) domains at the N-terminus, which are separated by the linker A region, a linker B region and a catalytic domain (Sada, Takano et al. 2001). Structural analysis of Syk indicates that hydrophobic residues in the linker A, the linker B and the catalytic domain interact to restrict Syk to an auto-inhibited closed conformation (Gradler, Schwarz et al. 2013). Following ligand-induced receptor aggregation, doubly phosphorylated ITAMs recruit cytosolic Syk by virtue of its SH2 domains and lock Syk at the BCR in a specific membrane topology (Futterer, Wong et al. 1998). This recruitment allows Syk conformational change to an open active structure (Tsang, Giannetti et al. 2008; Arias-Palomo, Recuero-Checa et al. 2009) and Syk access to key substrates (Engels, Engelke et al. 2008; Kulathu, Grothe et al. 2009). Syk structural modifications, which are linked to its activity, likely depend on multiple tyrosine, serine and threonine residue phosphorylations within the entire sequence of the kinase. Distinction between early- and late- induced phosphorylated sites demonstrated that early phosphorylations occur on tyrosine residues within the linker region and the kinase domain of

Syk (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011). Peaks of Syk phosphorylation levels for tyrosine residues 352 (Y<sup>352</sup>) and 323 (Y<sup>323</sup>) in the linker B region, as well as for tyrosine residues 525/526 (YY<sup>525/526</sup>) in the kinase domain, are observed after 2 min of BCR ligation in B cells (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011). Functional studies of these phosphorylated tyrosines reveal that 1) phospho-Y<sup>352</sup> is involved in the release of Syk kinase domain from an auto-inhibitory configuration and to activate signaling of ITAM-bearing receptors, 2) phospho-Y<sup>323</sup> is a major site of auto-phosphorylation or phosphorylation by Src kinases and inhibits antigen signaling, and 3) phospho-YY<sup>525/526</sup> contribute to an activated conformation of Syk and their replacements by phenylalanine residues lead to major signaling deficits in the cells (Geahlen 2009; Bohnenberger, Oellerich et al. 2011; Gradler, Schwarz et al. 2013). Thus, phosphorylation of Syk not only boosts its catalytic activity but also generates docking sites for effector proteins (Engels, Engelke et al. 2008; Geahlen 2009; Bohnenberger, Oellerich et al. 2011). Among the positive effectors of B cell activation, the most proximal Syk substrate in BCR-activated B cells is the scaffold protein BLNK (B-cell linker) and its phosphorylation leads to the formation of multimeric B-cell signalosomes with Btk (Burton's tyrosine kinase) and PLC $\gamma$ 2 (Phospholipase C gamma $\square$ 2), which launch several signaling cascades including calcium mobilization (Engels, Engelke et al. 2008; Kurosaki and Hikida 2009). Negative effectors of B cell activation such as the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Tamir, Dal Porto et al. 2000; Adachi, Wienands et al. 2001) and the E3 ubiquitin ligase Cbl (Rao, Dodge et al. 2002) can achieve termination of the Syk activity.

Dysregulated expression or function of Syk is associated to several forms of malignancies in hematopoietic cell types, including CLL (Efremov and Laurenti 2011). Moreover, constitutive and inducible phosphorylations of Syk, which occur in tonic- and antigen-dependent BCR signals respectively, are involved in CLL cell survival, apoptosis and trafficking (Deglesne, Chevallier et al. 2006; Baudot, Jeandel et al. 2009; Buchner, Fuchs et al. 2009; Gobessi, Laurenti et al. 2009; Quiroga, Balakrishnan et al. 2009; Le Roy, Deglesne et al. 2012). Given the implication of Syk in the pathogenesis of CLL, Syk has emerged as a

rational site to target BCR signaling pathways. Despite their uncompleted elucidated mechanisms, Syk inhibitors such as R788 (oral prodrug of R406), P505-15 and PRT318 become promising new strategies in CLL treatment (Efremov and Laurenti 2011; Feng and Wang 2014).

Our previous works demonstrated that sustained BCR stimulation allowed the distinction between two “non-responder” and “responder” groups of patients with the last one having a shorter progression-free survival and overall survival (Deglesne, Chevallier et al. 2006; Le Roy, Deglesne et al. 2012). By deciphering the signaling cascade mediated by BCR triggering, we demonstrated that Syk levels mandate a critical threshold to promote BCR signaling. Moreover, BCR competency is dependent on global phosphorylation of Syk in CLL B cells from the responder group (Le Roy, Deglesne et al. 2012).

In the present study, analysis of Syk global tyrosine phosphorylation profiles upon BCR ligation in CLL B cells from the non-responder and responder groups demonstrated elevated phospho-Syk levels in responding cells that were mainly found in the membrane compartment. Moreover, enhanced levels of phospho-Y<sup>352</sup> and phospho-Y<sup>323</sup>, but not phospho-Y<sup>525</sup>, were translated by the Syk capacity to form complexes with positive and negative effectors of the BCR signaling cascade. Treatment of CLL B cells with the R406 inhibitor blocked BCR-dependent activation of PLC $\gamma$ 2 and cell survival. Together, our data contributed to understand the molecular mechanisms underlying the function of Syk in disease progression of CLL.

## **Materials and methods:**

### **CLL cell isolation and culture**

After informed consent, peripheral blood samples were obtained from patients fulfilling diagnostic and immunophenotypic criteria for B CLL at the Service d'Hématologie Biologique, AP-HP Hôpital Avicenne, Bobigny, France. B cells were isolated by negative selection using RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies) following the manufacturer's instructions and purity was verified as previously described (Deglesne, Chevallier et al. 2006). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on density gradient and further analyzed either freshly or after viable thawing from liquid nitrogen storage in fetal bovine serum (FBS, PAA) 10% DMSO (Sigma). CLL cells were cultured fresh or after viable thawing in RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine.

### **Metabolic activity**

Two millions CLL cells were cultured for 72 hours in 24-well plates in presence or absence of coated rabbit anti-IgM antibody (10 µg / well; Jackson ImmunoResearch). Metabolic activity was determined using CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay according to the instructions of the manufacturer (Promega). Metabolic fold increase (% MTS) was determined following the formula:  $[(\text{absorbance stimulated } t=72\text{h}) - (\text{absorbance unstimulated } t=72\text{h})] / (\text{absorbance unstimulated } t=72\text{h}) \times 100$ ; MTS values > 25% and < 25% defined the responder and non-responder CLL groups, respectively (Deglesne, Chevallier et al. 2006). Syk inhibitor (R406, Selleck Chemicals) was added or not to cell culture media at concentration 0.5 µM.

### **Immuno-precipitation and immuno-blotting**

Responding and non-responding purified B cells stimulated or not with soluble donkey anti-IgM antibody (20 µg / mL; Jackson ImmunoResearch) for the indicated times were cross-linked with 1 mM DSP (Pierce) for 10 minutes at room temperature and stopped with 15 mM Tris-HCl at pH 7.5 for 15 minutes at 4°C. Then, cells were lysed in 1% CHAPS lysis buffer (5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, 100 mM sodium chloride, 2.5 mM EDTA, 10% glycerol) and supplemented by proteases inhibitors (0.1 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride, 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL pepstatin and 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich)). After determination of protein concentration by BCA method (Pierce), immunoprecipitations were carried out using mouse anti-human Syk (clone 4D10) or relevant isotypic control (BD Pharmingen) antibody (mAb). After adsorption of the antibody on protein G Sepharose, beads were washed 3 times with 1% CHAPS buffer, subjected to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with the indicated antibodies: mouse anti-Syk, mouse anti-phospho-Zap-70 (Y319) / Syk (Y352), mouse anti-c-Cbl, mouse anti-Shp-1, mouse anti-Lyn (BD Pharmingen), mouse anti-phosphotyrosine (4G10 Platinum; Millipore), rabbit anti-phospho-Syk (Y525/526), rabbit anti-phospho-Syk (Y323), rabbit anti-HSP 90, rabbit anti-PLCγ2, rabbit anti-Btk, rabbit anti-BLNK, rabbit anti-Ezrin/Radixin/Moesin and rabbit anti-phospho-Ezrin (T567)/Radixin (T564)/Moesin (T558), (Cell Signalling). Detection was achieved using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or -rabbit Abs and chemi-luminescence (Enhanced Chemi Luminescence, Pierce) visualized with the ChemiDoc MP Imaging System (Biorad). Blots were analyzed and quantified using Image Lab software (Biorad).

### **Sub-cellular distribution**

Responding and non-responding purified B cells (10 x 10<sup>6</sup> cells / condition) stimulated or not with soluble anti-IgM for the indicated times were subjected to the Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit (Pierce). Resulting samples were kept intact or subjected to

an anti-Syk immunoprecipitation. All samples were subjected to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with the previously indicated antibodies.

### **Phosphoflow assays**

Briefly, freshly purified PBMC (500,000 cells / condition) were incubated in RPMI (PAA) in presence or not of soluble AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey anti-human IgM (20 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) and co-treated with Syk inhibitor (2 µM) for the indicated times. Cell surface molecules were further labeled in Phosphate-buffered saline (PBS) 1X, supplemented with 2% FBS and containing saturating concentrations of monoclonal antibodies anti-CD20/APC-Cy7; CD5/PerCP-Cy5.5, CD3/PE-Cy7 or relevant isotypic controls (BD Biosciences) for 45 min on ice. Then, cells were fixed with Lyse/Fix Buffer 1X (BD Phosflow) for 10 min at room temperature and permeabilized with Perm/Wash Buffer I 1X according to manufacturer's protocols (BD Biosciences). Intracellular phosphorylated PLCγ<sub>2</sub> was labeled by incubating cells over night at 4°C in Perm/Wash Buffer I 1X and saturating concentrations of monoclonal antibody PE mouse anti-PLCγ<sub>2</sub> (pY759) or relevant isotypic control (BD Phosflow). Samples were washed 3 times and data were acquired by flow cytometry (FACS-CANTO; Becton Dickinson). Data analyses were performed using BD FACSDiva software.

### **Data analysis and statistics**

Values are presented as mean ± SEM. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. A 2-tailed unpaired Student *t* test was used to compare individual groups. Statistical analyses were performed using the GraphPad program (GraphPad Software Inc).



## Results:

### **Differential magnitude and duration of Syk phosphorylation between CLL and normal B cells.**

Syk kinase activity is modulated by its phosphorylation status, which depends on the modes and duration of BCR stimulation (Futterer, Wong et al. 1998; Arias-Palomo, Recuero-Checa et al. 2009; Gradler, Schwarz et al. 2013). Given that Syk phosphorylation levels were shown to be linked to BCR-mediated CLL B survival (Deglesne, Chevallier et al. 2006; Baudot, Jeandel et al. 2009; Carsetti, Laurenti et al. 2009; Le Roy, Deglesne et al. 2012), we hypothesized that differential Syk activities might be at the origin of the differential survival observed in CLL B cells between non-responder and responder cases.

To test this hypothesis, we first analyzed the early global tyrosine phosphorylation kinetics of this proximal effector of the BCR-mediated signaling pathways in CLL and normal B cells. The latters were stimulated (soluble F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM) and global Syk phosphorylation was determined at various time points by immunoblotting with phospho-tyrosine antibody after Syk immunoprecipitation (Figure 1A). To compare the kinetics of stimulation of Syk in the studied B cells, the phospho-tyrosine Syk ratios were calculated after normalizing each band to the Syk immuno-precipitated (Figure 1B). Western blots revealed different patterns of Syk phosphorylation in leukemic and normal B cells. Despite high basal phospho-tyrosine Syk levels, BCR stimulation allowed weak enhancement in non-responding (NR, mean=1.5; n=8) and a stronger one in responding cells (R, mean=5.8; n=10), which were maximal at 2 min and then slightly decreased during the stimulation. In contrast and as described previously (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011), Syk phosphorylation levels strongly increased at 2 min (mean= 24.9; n=7) and then decreased in stimulated normal B cells without reaching the levels measured in CLL B cells.

Compared to the normal B cells, the differential phospho-Syk ranges in both CLL B lymphocytes in response to various time points of BCR stimulation suggested that Syk

activation was altered in leukemic cells with a more pronounced effect in the non-responding cells.

**BCR-mediated tyrosine phosphorylated form of Syk is highly enriched in the membrane compartment of the responding CLL B cells compared to the non-responding cells.**

Upon BCR cross-linking, Syk is recruited to membrane antigen micro-clusters to be phosphorylated and to generate various functions in normal B cells (Futterer, Wong et al. 1998; Gupta and DeFranco 2003; Weber, Treanor et al. 2008; de Castro 2011). To determine whether the differential Syk phosphorylation observed in non-responding and responding cells was due to an altered localization of this kinase, we examined the distribution of total and phosphorylated Syk species between cytosolic and membrane compartments. After establishing the validity of our fractionation protocol on total proteins by using HSP90 and Lyn as markers of cytosolic and membrane fractions respectively, Syk of both fractions obtained from unstimulated (0) and stimulated (2 and 10 min) cells was immunoprecipitated and immunoblotted for its phospho-tyrosine and total forms (Figure 2). As shown in total cell lysates and after Syk immunoprecipitation, this kinase was mainly present in the cytoplasmic fraction of the CLL B cells. Interestingly, after 2- and 10-minute stimulation, phosphorylated Syk was highly enriched into membrane compartment, as well as in the cytoplasmic fraction, of the responding cells compared to non-responding ones. In contrast, very weak Syk phosphorylation levels were observed in membrane and cytoplasm of the B lymphocytes from the non-responder cases after 2 and 10 min BCR triggering.

These data suggested that Syk was recruited to membrane IgM-bound receptor to be partially phosphorylated and then released into the cytoplasm of the responding B cells. In contrast, the poor Syk phosphorylation in both fractions of the non-responding cells suggested that this kinase was not able to form an efficient signaling complex.

## **Differential kinetics of specific phospho-tyrosine Syk in response to BCR stimulation between CLL and Normal B cells.**

In normal B cells, the majority of early phosphorylation occurs on tyrosine residues located within the linker region and kinase domain of Syk (Futterer, Wong et al. 1998; Geahlen 2009; Bohnenberger, Oellerich et al. 2011; Gradler, Schwarz et al. 2013). Based on their major roles in BCR signaling cascade, we analyzed the kinetics of phosphorylation of the tyrosine residues 352, 525/526 and 323 in unstimulated and stimulated CLL and normal B cells, which were processed as described in the Figure 1. As shown in Figure 3A, Syk immunoprecipitation followed by western blotting analysis revealed that the patterns of Y<sup>352</sup> phosphorylation were the same in all B cell samples whereas the profiles of phospho-Y<sup>525/526</sup> and -Y<sup>323</sup> were quite different among the studied B cells. Quantification of the phospho-signals and their graphed representation (Figure 3B) confirmed that the phospho-Y<sup>352</sup> levels increased upon anti-IgM stimulation with approximately the same amplitude after 2 min stimulation and then did not change significantly for at least 30 min in non-responding and responding B cells, as well as in their normal counterparts. In contrast, phospho-Y<sup>525/526</sup> levels, which were enhanced in normal stimulated B cells, were not modified in both stimulated CLL B cells. Moreover, phospho-Y<sup>323</sup> levels, which were improved in normal B cells and responding CLL B cells upon BCR ligation, were slightly modified in non-responding B cells.

Thus, equivalent phospho-Y<sup>352</sup> kinetics suggested that Syk was released from its auto-inhibitory conformation in response to BCR stimulation in normal and CLL cells. However, the absence of modified phospho-Y<sup>525/526</sup> kinetic profile in CLL B cells proposed that Syk was already fully activated in this leukemic model. Moreover, higher phosphorylated tyrosine residue 323 levels in responding cells might be explained by larger conformational changes of this kinase that allowed exposition of more multiple phospho-acceptor sites and its interaction with various partners.

**Interacting capacity of Syk is stronger in CLL B cells from the responding patients.**

Because phosphorylation can inhibit or promotes protein-protein associations (Geahlen 2009; Kulathu, Grothe et al. 2009; Mocsai, Ruland et al. 2010), we next investigated whether Syk was able to interact with positive or negative effectors of the BCR signaling pathways in non-responding and responding cells during a kinetic of stimulation. After processing CLL B cells as described in Figures 1 and 3, immunoprecipitated Syk complexes were identified by western blot with the appropriate antibodies. After testing the specificity of the Syk interaction with various partners (Figure 4A), our results showed that Syk associated with positive (BLNK, Btk, PLC $\gamma$ 2) and negative (c-Cbl and SHP-1) effectors in both CLL cells in absence of anti-IgM stimulation (Figure 4B). Quantification of the associated proteins at different time points and compared to unstimulated cells revealed that the Syk complex levels with BLNK (Figure 4C), Btk (Figure 4D), PLC $\gamma$ 2 (Figure 4E), c-Cbl (Figure 4F) and Shp1 (Figure 4G) did not change significantly in non-responding cells. In contrast, significant accumulations of Syk complexes were observed with all partners in responding cells upon anti-IgM stimulation.

These results suggested that Syk, which is partially phosphorylated in responding cells, was able to form complexes with different proteins compared to non-responding cells. Interestingly, the negative regulators, such as c-Cbl and Shp-1, interacted with Syk earlier compared to the positive regulators.

**Partners of Syk are not differentially expressed and subcellular distributed between non-responding and responding CLL B cells.**

Given the differential Syk complex formation between both CLL B samples, we further analyzed the partner expression levels or their subcellular distribution in non-responding and responding B cells. Study by western blots presented Figure 5A revealed heterogeneous expression levels of the partners in non-responding and responding B cells.

Moreover, subcellular distribution analysis of Btk, PLC $\gamma$ 2, c-Cbl and Shp1 in absence or in presence of stimulation (anti-IgM for 2 and 10 min) showed that all partners were mainly present in the cytoplasmic fractions of CLL B samples without any change upon BCR ligation (Figure 5B).

Thus, the heterogeneous expression of the various partners and their subcellular distribution cannot explain the differential interacting capacity of Syk between non-responding and responding CLL B cells but reinforced that Syk activity was mainly involved. Interestingly, positive regulators were not detected in the membrane fractions whereas negative ones were in both CLL cell samples.

### **Inhibition of Syk led to decrease PLC $\gamma$ 2 activation and survival in responding B cells but not in non-responding ones.**

To estimate the functional impact of the Syk complexes in BCR signaling cascade of the malignant B cells, the PLC $\gamma$ 2 activity was measured during different times of anti-IgM stimulation (0, 2, 5, 10 and 30 min) by the phosphoflow approach (Le Roy, Deglesne et al. 2012). Results presented Figure 6A confirmed the absence of significant increase of the phospho-Y<sup>759</sup> PLC $\gamma$ 2 in non-responding cells during the kinetic study. In contrast, phospho-Y<sup>759</sup> PLC $\gamma$ 2 was significantly increased from 2 min to 30 min in response to BCR stimulation in responding cells.

We next interfered with the Syk activity in responding CLL B cells by using the R406 inhibitor (Efremov and Laurenti 2011). We first determined that 2  $\mu$ M R406 was the appropriate concentration in a short drug treatment to decrease BCR-dependent Syk phosphorylation without altering the totals or phosphorylation levels of another protein that is not described to be part of the BCR signaling (Figure S1). Concomitant R406 treatment and anti-IgM stimulation of the responding cells showed that Syk inhibition significantly decreased phospho-PLC $\gamma$ 2, demonstrating that Syk activity was required for the PLC $\gamma$ 2 one.

We further determined whether Syk activity might affect the differential BCR-induced survival between non-responding and responding cells. To do so, we measured the metabolic activity in both CLL samples, which were stimulated or not and treated in presence or in absence of the R406 Syk inhibitor (Figure 6C). Consistent with our previous published data (Deglesne, Chevallier et al. 2006; Le Roy, Deglesne et al. 2012), results demonstrated a strong increase of the metabolic activity in responding cells (n=39) compared to non-responding cells (n=25). Whereas R406 treatment did not change significantly the percentage of metabolic activity of the non-responding cells, it strongly decreased it in the responding cells. These data demonstrated that Syk activity is required for BCR-mediated cell survival and R406 treatment strongly interfered with it.

## **Discussion:**

Previous works, including ours, demonstrated the crucial role of the BCR signaling in CLL pathogenesis and disease progression. In this context, we have shown that *ex-vivo* BCR engagement allowed the distinction of two patients' groups with the non-responder and responder cases that were relevant through measurement of progression-free survival and overall survival in CLL patients (Deglesne, Chevallier et al. 2006; Vlad, Deglesne et al. 2009; Le Roy, Deglesne et al. 2012). Based on the differential Syk phosphorylation between non-responding and responding cells, the current study focused on the BCR-dependent Syk-phosphorylation and -complex formation and provided evidences for the Syk activity in BCR-mediated cell survival of the responding CLL cells.

Syk plays a central role in many immune signaling pathways and is activated by a complex mechanism involving phospho-ITAM binding and phosphorylation (Arias-Palomo, Recuero-Checa et al. 2009; Geahlen 2009; Bohnenberger, Oellerich et al. 2011; de Castro 2011; Gradler, Schwarz et al. 2013). Despite the constitutive tyrosine phosphorylated Syk in unstimulated CLL cells (Chen, Apgar et al. 2005; Deglesne, Chevallier et al. 2006; Efremov, Gobessi et al. 2007; Baudot, Jeandel et al. 2009; Buchner, Fuchs et al. 2009; Le Roy, Deglesne et al. 2012), our kinetic studies demonstrated that BCR triggering allowed a significant enhancement of phospho-tyrosine Syk levels in responding cells. This increase, which was occurring in response to 2 min stimulation and was lower than the one observed in normal B cells, was associated with phospho-Syk translocation to the membrane compartment of the responding cells only. In line with the higher surface IgM levels in CLL B cells from the responder group (Le Roy, Deglesne et al. 2012), these results are in agreement with the current model that proposes that Syk phosphorylation is mediated through its binding to phospho-ITAM-bearing receptors and participates to Syk activation through its phosphorylation (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011; de Castro 2011). This higher phospho-tyrosine Syk levels might contribute to reach a responsiveness threshold leading to CLL cell survival in responding cells.

Analysis of phospho-Y352 Syk, which is currently accepted to participate to the transition from an auto-inhibited to activated Syk conformation (Furlong, Mahrenholz et al. 1997), demonstrated similar patterns in all stimulated B cells. As we previously showed in 10-min stimulated CLL cells (Le Roy, Deglesne et al. 2012), the phosphorylation of this Src-family kinase site suggested that Syk was released from its closed autoinhibitory conformation but did not contribute to the differential BCR-dependent CLL cell survival. Moreover, our data revealed that the survival advantage of the responding cells was not dependent on the BCR-mediated phosphorylation of the Syk activation loop tyrosines (Y525 and Y526). Described as early phospho-acceptor sites upon BCR engagement (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011), *trans*-autophosphorylation at tyrosines 525/526 are supposed to complete the full activation of Syk and their replacements by phenylalanine residues led to major signaling deficits in the normal B cells (Geahlen 2009). In agreement with constitutive phosphorylation of both Y525 and Y526 in Syk found in several human diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma cell lines (Kuppers 2005; Gururajan, Jennings et al. 2006) but in disagreement with the absence of detectable constitutive phosphorylation on these residues in human and mouse CLL cells (Chen, Monti et al. 2008; Carsetti, Laurenti et al. 2009; Young, Hardy et al. 2009), our data revealed that Syk was phosphorylated in basal condition. However, no additional increase was observed upon BCR stimulation in all CLL B cells, proposing that overexpressed Syk exists in an activated conformation in leukemic cells and could be considered as hallmark of the CLL disease. Further investigation of the phospho-specific forms of Syk allowed us to identify the differential phospho-Y323 Syk levels between non-responding and responding B cells upon BCR stimulation. This tyrosine residue, which is located in the exposed interdomain linker (Furlong, Mahrenholz et al. 1997) that was not defined in the Syk crystal structure (Gradler, Schwarz et al. 2013), is an auto-phosphorylation *in vitro* and a Src-family kinase site in activated B cells (Keshvara, Isaacson et al. 1998). Its phosphorylation plays a dual role in Syk-dependent signaling by inhibiting Syk activity through the binding of the E3 ubiquitin ligase Cbl (Yankee, Keshvara et al. 1999;



Hong, Yankee et al. 2002) and by allowing Syk complex with the regulatory subunit of the phosphoinositol-3-kinase (PI3K) (Moon, Post et al. 2005), respectively. Thus, the higher phospho-tyrosine levels as well as phospho-Y323 levels in stimulated responding cells suggested that BCR-dependent Syk phosphorylation generated docking sites for binding downstream signals involved in CLL cell survival. Interestingly, our data revealed that Syk exists in preformed complexes prior to BCR ligation in non-responding and responding cells. Associated with the higher basal Syk phosphorylation ratio observed in CLL B cells compared to normal B cells, these complexes could result from chronic exposure to endogenous antigens of the freshly purified CLL B lymphocytes, tonic signal that is initiated without external antigens and is crucial for the maturation and survival of B cells (Pierce and Liu 2010; Stevenson, Krysov et al. 2011) or antigen-independent cell-autonomous signaling that is dependent on the HCDR3 and an internal VQR epitope of the BCR (Duhren-von Minden, Ubelhart et al. 2012). Moreover, Syk complexes were strengthened upon BCR triggering in responding cells only, independently of the partner expression levels or their detected subcellular localization. The absence of BCR-inducible Syk complexes in non-responding cells could be explained by the very weak phospho-tyrosine Syk levels at their plasma membrane. Thus, it is tempting to speculate that Syk could be post-translationally modified on serine residues, providing direct docking sites for other proteins and limiting early BCR signaling events (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011).

Based on the differential BCR-mediated calcium uptake between non-responding and responding cells (Le Roy, Deglesne et al. 2012), we focused our attention on Syk partners implicated in the dynamic regulation of the BCR-triggered calcium response in normal B cells (Engels, Engelke et al. 2008). According to this model, our data showed a molecular complex formation between Syk, BLNK, Btk and PLC $\gamma$ 2 in responding cells, despite the absence of detectable BLNK, Btk and PLC $\gamma$ 2 in the membrane compartment, except for Syk. These data suggested that the Syk partners were transiently membrane tethering, through the leucine zipper/SH2 domain of BLNK (Kohler, Storch et al. 2005) and the PH domains of Btk and

PLC $\gamma$ 2 (Bolland, Pearse et al. 1998; Falasca, Logan et al. 1998), to be activated and then accumulated as complexes in the cytoplasm. Because the Syk activity is efficiently controlled by the protein tyrosine phosphatases (Rolli, Gallwitz et al. 2002) and by the Cbl family members (Rao, Dodge et al. 2002; Geahlen 2009), we also found that Syk associated with the phosphatase SHP-1 and the E3 ubiquitin ligase c-Cbl in responding cells. In contrast to positive partners, both negative partners were detected in the membrane compartment of the responding cells proposing that they were attenuating early propagation of the BCR signaling in the leukemic cells compared to normal B cells. Based on the elevated levels of hypophosphorylated form of c-Cbl found in CLL B cells from progressive patients (Mankai, Eveillard et al. 2007), it is tempting to speculate about Shp-1 dephosphorylating and inactivating c-Cbl in the Syk signalosome of the responding cells. Moreover, the undetected ubiquitinated form of Syk in leukemic B cells (data not shown) suggested that c-Cbl might act as an adaptor partner as it was already proposed in immature B cells (Kant, De et al. 2002; Joshi, Singh et al. 2014).

Functional analysis of the BCR-mediated Syk complexes on PLC $\gamma$ 2 phosphorylation with the Syk inhibitor R406 in CLL cells (Efremov and Laurenti 2011) demonstrated that interfering with Syk activity negatively impacted PLC $\gamma$ 2 activation, as well as phosphorylation of BLNK and Btk (preliminary results not shown), in responding cells only. Moreover, the BCR-mediated survival advantage of the responding cells was lost in presence of the R406 inhibitor demonstrating that Syk activity contributed to CLL cell survival. Thus, by decreasing the phospho-tyrosine levels of Syk and its downstream partner ones, as well as by likely disturbing Syk association with its partners, these data provided mechanistic insight into the therapeutic effects of the Syk inhibitor R406 in patients with progressive CLL disease.

## **Acknowledgments**

This study was supported by INSERM and University Paris 13. MQ was the recipient of Ligue Nationale Contre le Cancer. We acknowledge S. Saint Georges and H. Roudot for assistance in CLL sample preparation.

## **Authorship Contributions**

M.Q., S.L.C. and L.G. performed the experiments and analyzed the data. V.L. and F.A.C. provided patients' samples. N.V.B. and C.L.R. designed the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript.

## Figure legends:

Figure 1. **Differential magnitude and duration of Syk phosphorylation between CLL and normal B cells.** CLL non-responding (NR), responding (R) and normal B cells were incubated for the indicated times (min) in presence of soluble F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (20 µg/ml). After lysis, 90% of the cell lysates were immuno-precipitated with an anti-Syk antibody ( $\alpha$ -Syk IP) and 10% were kept as total cell lysates (Totals). Tyrosine-phosphorylated ( $\alpha$ -pTyr) and total Syk ( $\alpha$ -Syk) expression levels were analyzed by western blotting; anti-HSP90 antibody was used as a loading control (A). After quantification, the phospho-Syk/Syk ratios were calculated, normalized to time 0 and graphed as pY-Syk range in CLL B cells (left, NR n=7 and R n=12) and normal B cells (right, n=7).

Figure 2. **Membrane localisation of BCR-mediated phosphorylated tyrosine Syk in responding CLL B cells.** CLL non-responding (NR) and responding (R) B cells were unstimulated (0 min) or stimulated for 2 and 10 minutes with soluble F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (20 µg/ml). Lysates were fractionated into cytoplasmic (Cy) and membrane (Mb) compartments. Then, 90% of the both fractions were immuno-precipitated with an anti-Syk antibody ( $\alpha$ -Syk IP) and 10% were kept (Totals) before protein separation and immunoblot with the indicated antibodies. Anti-HSP90 and anti-Lyn antibodies were used as cytoplasmic and membrane markers, respectively. Western blots show one representative experiment of 3 NR/R couples.

Figure 3. **Differential kinetics of phospho-tyrosine Syk species in response to BCR stimulation between CLL and normal B cells.** CLL non-responding (NR), responding (R) and normal B cells were incubated for the indicated times (min) in presence of soluble F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM (20 µg/ml). After lysis, 90% of the cell lysates were immuno-precipitated with an anti-Syk antibody ( $\alpha$ -Syk IP) and 10% were kept aside (Totals). Tyrosine-

phosphorylated specific (pY<sup>352</sup>,  $\alpha$ -pY<sup>525/526</sup> and pY<sup>323</sup>) and total Syk ( $\alpha$ -Syk) expression levels were analyzed by western blotting (A). After quantification, the phospho specific tyrosine Syk / immunoprecipitated Syk ratios were calculated, normalized to time 0 and graphed in non responding (NR n=7; left), responding (R n=5; middle) CLL B cells, as well as in normal B cells (n=7; right).

Figure 4. **Differential interaction of Syk in non-responding and responding B cells.** *A*; Responding cells were lysed and immunoprecipitated (IP) without (-) or with anti-Syk antibody (+). Comparison of lines "IP: -" and "IP: +" indicated the specificity of the interactions between Syk and BLNK, Btk or PLC $\gamma$ 2 as revealed with various antibodies used for the western blots. *B*; Non-responding (NR) and responding (R) CLL B cells were stimulated (+) or not (-) with anti-IgM for 0, 2, 5, 10 and 30 minutes. After processing CLL B cells as described in Figure 1, expression levels of the interacting partners (BLNK, Btk, PLC $\gamma$ 2, c-Cbl and Shp-1) were quantified and graphed: *C*; BLNK (NR=4 and R=9), *D*; Btk (NR=4 and R=8), *E*; PLC $\gamma$ 2 (NR=4 and R=8), *F*; c-Cbl (NR=4 and R=9) and *G*; Shp-1 (NR=4 and R=8).

Figure 5. **Syk's partner expressions and their subcellular distributions in CLL B cells.** (*A*) Unstimulated CLL B cells (4 non-responding B cell samples (NR) and 3 responding B cell samples (R)) were lysed and estimation of the expression levels of BLNK, Btk, PLC $\gamma$ 2, c-Cbl and Shp1 were evaluated after hybridizing the blots with the appropriate antibodies. (*B*) CLL non-responding (NR) and responding (R) were unstimulated (0 min) or stimulated for 2 and 10 minutes with anti-IgM (20  $\mu$ g/ml). Lysates were fractionated into cytoplasmic (Cy) and membrane (Mb) compartments and then the partner expression levels were estimated by using the appropriate antibodies. Anti-HSP90 and anti-Lyn antibodies were used to validate our protocol. Blots showed representative experiment of 3 NR/R couples.

**Figure 6. R406 inhibition of Syk decreased PLC $\gamma$ 2 activation and survival in responding B cells but not in non-responding ones.** (A) Phospho-Y<sup>759</sup> PLC $\gamma$ 2 levels were analyzed using a specific PE-coupled antibody in CLL B cells (CD20<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) by phosphoflow cytometry analysis in 4 non-responding (NR) and 11 responding (R) cells after 0, 2, 5, 10 and 30 minutes of incubation with anti-IgM antibody. Phospho-PLC $\gamma$ 2 fold increases were calculated and graphed. (B) Responding B cells (R; n=9) were stimulated for the indicated times in presence (R-R406) or not (R-NT) of 2  $\mu$ M R406 and processed as described in A). (C) Fold increase of metabolic activity (% MTS) was determined on 72-hour BCR stimulation for 25 non-responding (NR) and 39 responding (R) CLL cells treated in the presence or not of R406 (0.5  $\mu$ M).

**Supplemental Figure S1. : Kinetics of BCR-dependent phospho-Syk in presence of various doses of R406 in responding CLL B cells.** One representative experiment (n=3) done from responding cells stimulated with anti-IgM for 0, 2 and 10 min in absence (0) or in presence of increasing doses of R406 (2, 4 and 10  $\mu$ M). Cells were lysed, Syk protein was immunoprecipitated ( $\alpha$ -Syk IP) and phosphorylated tyrosine Syk and total Syk species were revealed with the appropriate antibodies. The pERM and ERM levels were used as negative controls.

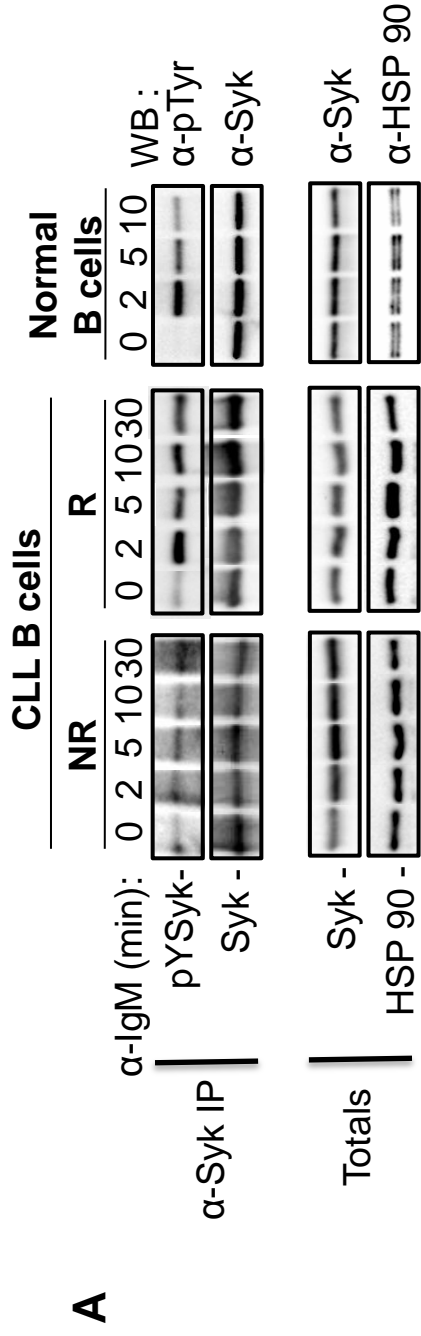
## References

- Adachi, T., J. Wienands, et al. (2001). "SHP-1 requires inhibitory co-receptors to down-modulate B cell antigen receptor-mediated phosphorylation of cellular substrates." *J Biol Chem* **276**(28): 26648-26655.
- Arias-Palomo, E., M. A. Recuero-Checa, et al. (2009). "Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1794**(8): 1211-1217.
- Baudot, A. D., P. Y. Jeandel, et al. (2009). "The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression." *Oncogene* **28**(37): 3261-3273.
- Bohnenberger, H., T. Oellerich, et al. (2011). "Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells." *Eur J Immunol* **41**(6): 1550-1562.
- Bolland, S., R. N. Pearse, et al. (1998). "SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk." *Immunity* **8**(4): 509-516.
- Buchner, M., S. Fuchs, et al. (2009). "Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia." *Cancer Res* **69**(13): 5424-5432.
- Carsetti, L., L. Laurenti, et al. (2009). "Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation." *Cell Signal* **21**(7): 1187-1194.
- Chen, L., J. Apgar, et al. (2005). "ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **105**(5): 2036-2041.
- Chen, L., S. Monti, et al. (2008). "SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma." *Blood* **111**(4): 2230-2237.
- de Castro, R. O. (2011). "Regulation and function of syk tyrosine kinase in mast cell signaling and beyond." *J Signal Transduct* **2011**: 507291.
- Deglesne, P. A., N. Chevallier, et al. (2006). "Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression." *Cancer Res* **66**(14): 7158-7166.
- Duhren-von Minden, M., R. Ubelhart, et al. (2012). "Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling." *Nature* **489**(7415): 309-312.
- Efremov, D. G., S. Gobessi, et al. (2007). "Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells." *Autoimmun Rev* **7**(2): 102-108.
- Efremov, D. G. and L. Laurenti (2011). "The Syk kinase as a therapeutic target in leukemia and lymphoma." *Expert Opin Investig Drugs* **20**(5): 623-636.
- Engels, N., M. Engelke, et al. (2008). "Conformational plasticity and navigation of signaling proteins in antigen-activated B lymphocytes." *Adv Immunol* **97**: 251-281.
- Falasca, M., S. K. Logan, et al. (1998). "Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting." *EMBO J* **17**(2): 414-422.
- Feng, G. and X. Wang (2014). "Role of spleen tyrosine kinase in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Lymphoma* **55**(12): 2699-2705.
- Furlong, M. T., A. M. Mahrenholz, et al. (1997). "Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk." *Biochim Biophys Acta* **1355**(2): 177-190.
- Futterer, K., J. Wong, et al. (1998). "Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide." *J Mol Biol* **281**(3): 523-537.
- Geahlen, R. L. (2009). "Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor." *Biochim Biophys Acta* **1793**(7): 1115-1127.

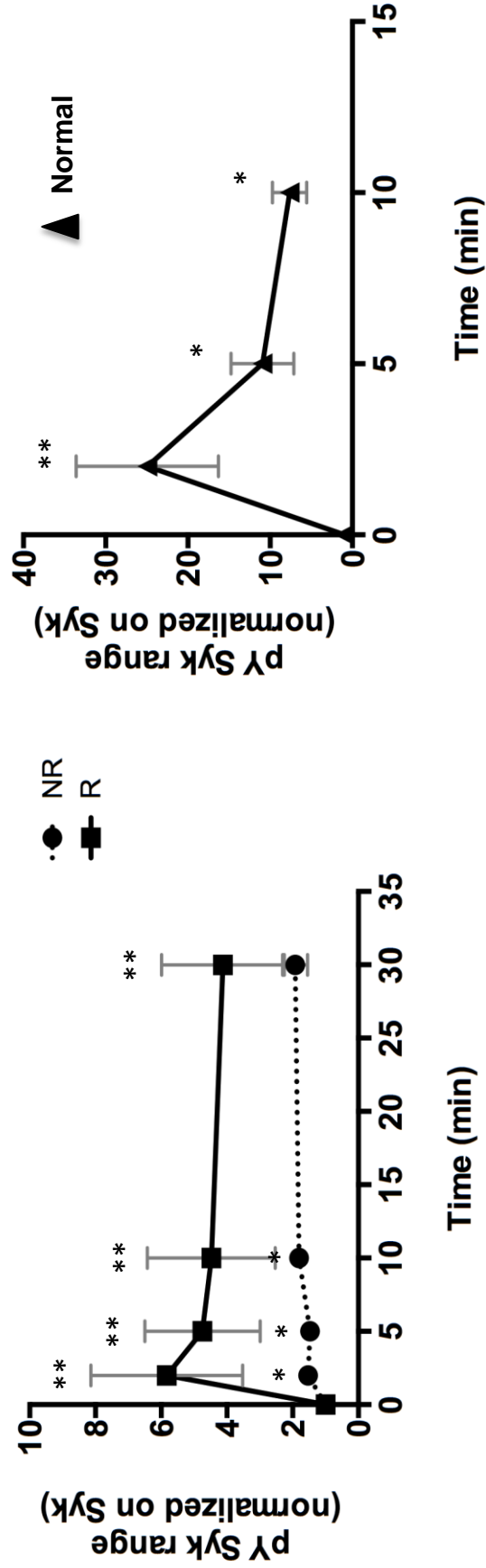
- Gobessi, S., L. Laurenti, et al. (2009). "Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells." Leukemia **23**(4): 686-697.
- Gradler, U., D. Schwarz, et al. (2013). "Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch." J Mol Biol **425**(2): 309-333.
- Gupta, N. and A. L. DeFranco (2003). "Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation." Mol Biol Cell **14**(2): 432-444.
- Gururajan, M., C. D. Jennings, et al. (2006). "Cutting edge: constitutive B cell receptor signaling is critical for basal growth of B lymphoma." J Immunol **176**(10): 5715-5719.
- Hong, J. J., T. M. Yankee, et al. (2002). "Regulation of signaling in B cells through the phosphorylation of Syk on linker region tyrosines. A mechanism for negative signaling by the Lyn tyrosine kinase." J Biol Chem **277**(35): 31703-31714.
- Joshi, S., A. R. Singh, et al. (2014). "A PKC-SHP1 signaling axis desensitizes Fcγ3 receptor signaling by reducing the tyrosine phosphorylation of CBL and regulates Fcγ3 mediated phagocytosis." BMC Immunol **15**: 18.
- Kant, A. M., P. De, et al. (2002). "SHP-1 regulates Fcγ3 receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC." Blood **100**(5): 1852-1859.
- Keshvara, L. M., C. C. Isaacson, et al. (1998). "Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling." J Immunol **161**(10): 5276-5283.
- Kohler, F., B. Storch, et al. (2005). "A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65." Nat Immunol **6**(2): 204-210.
- Kulathu, Y., G. Grothe, et al. (2009). "Autoinhibition and adapter function of Syk." Immunol Rev **232**(1): 286-299.
- Kuppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." Nat Rev Cancer **5**(4): 251-262.
- Kurosaki, T. and M. Hikida (2009). "Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes." Immunol Rev **228**(1): 132-148.
- Le Roy, C., P. A. Deglesne, et al. (2012). "The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia." Blood **120**(2): 356-365.
- Mankai, A., J. R. Eveillard, et al. (2007). "Is the c-Cbl proto-oncogene involved in chronic lymphocytic leukemia?" Ann N Y Acad Sci **1107**: 193-205.
- Mocsai, A., J. Ruland, et al. (2010). "The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions." Nat Rev Immunol **10**(6): 387-402.
- Moon, K. D., C. B. Post, et al. (2005). "Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem **280**(2): 1543-1551.
- Pierce, S. K. and W. Liu (2010). "The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences." Nat Rev Immunol **10**(11): 767-777.
- Quiroga, M. P., K. Balakrishnan, et al. (2009). "B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406." Blood **114**(5): 1029-1037.
- Rao, N., I. Dodge, et al. (2002). "The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system." J Leukoc Biol **71**(5): 753-763.
- Rolli, V., M. Gallwitz, et al. (2002). "Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop." Mol Cell **10**(5): 1057-1069.
- Sada, K., T. Takano, et al. (2001). "Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase." J Biochem **130**(2): 177-186.
- Stevenson, F. K., S. Krysov, et al. (2011). "B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia." Blood **118**(16): 4313-4320.



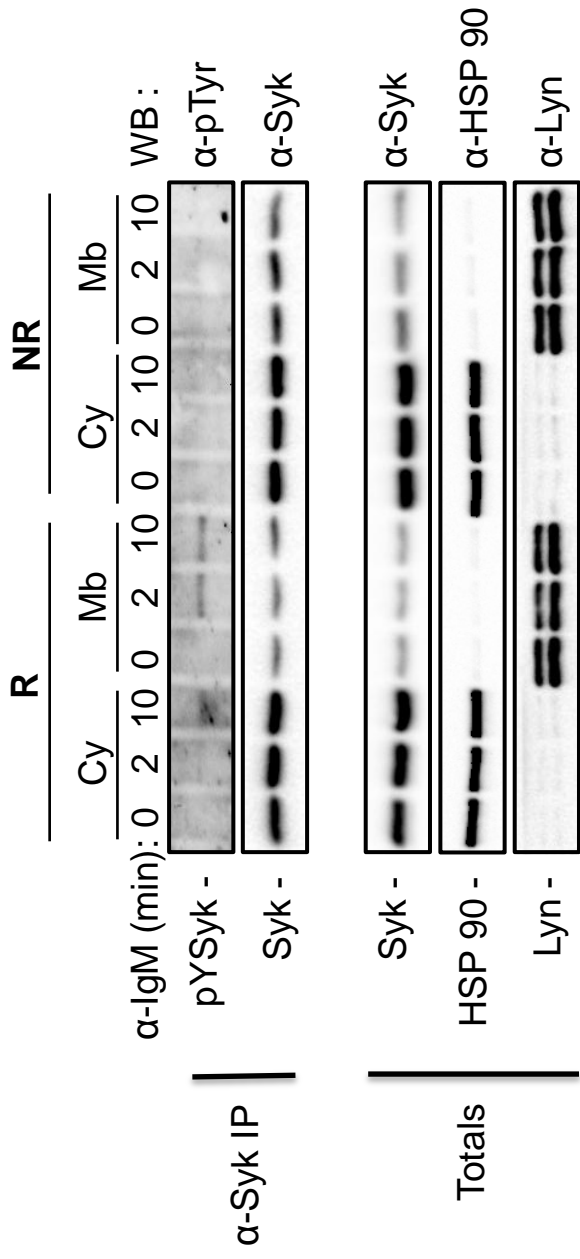
- Tamir, I., J. M. Dal Porto, et al. (2000). "Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction." Curr Opin Immunol **12**(3): 307-315.
- Tsang, E., A. M. Giannetti, et al. (2008). "Molecular mechanism of the Syk activation switch." J Biol Chem **283**(47): 32650-32659.
- Vlad, A., P. A. Deglesne, et al. (2009). "Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease." Cancer Res **69**(16): 6387-6395.
- Weber, M., B. Treanor, et al. (2008). "Phospholipase C-gamma2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen." J Exp Med **205**(4): 853-868.
- Yankee, T. M., L. M. Keshvara, et al. (1999). "Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain." J Immunol **163**(11): 5827-5835.
- Young, R. M., I. R. Hardy, et al. (2009). "Mouse models of non-Hodgkin lymphoma reveal Syk as an important therapeutic target." Blood **113**(11): 2508-2516.



**B**

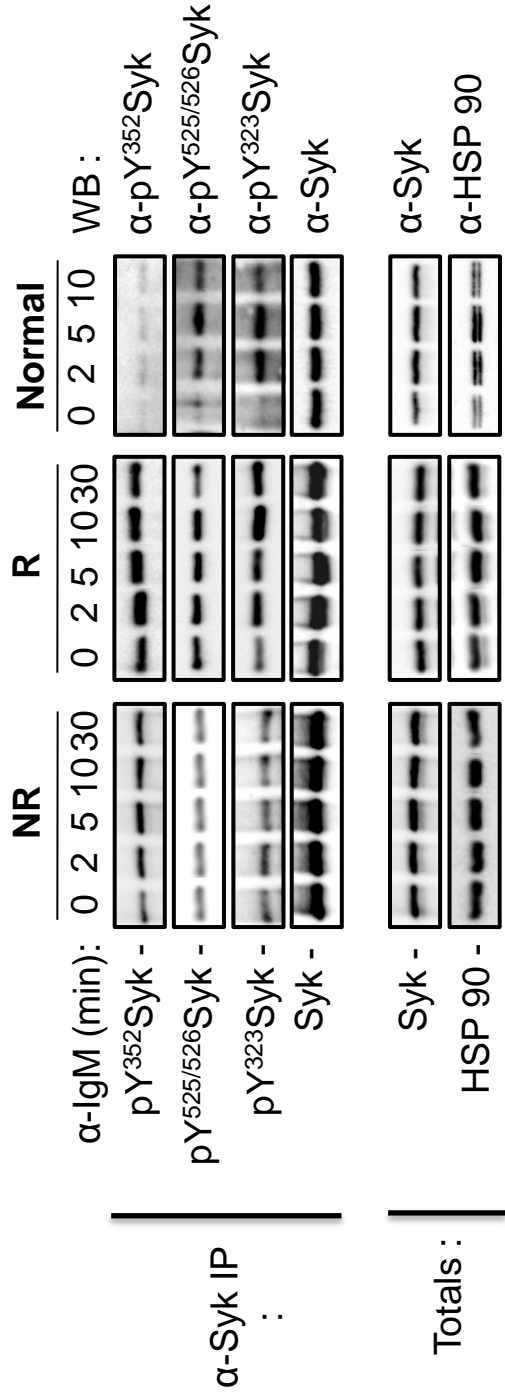


**Figure 1: Differential magnitude and duration of Syk phosphorylation between CLL and normal B cells.**

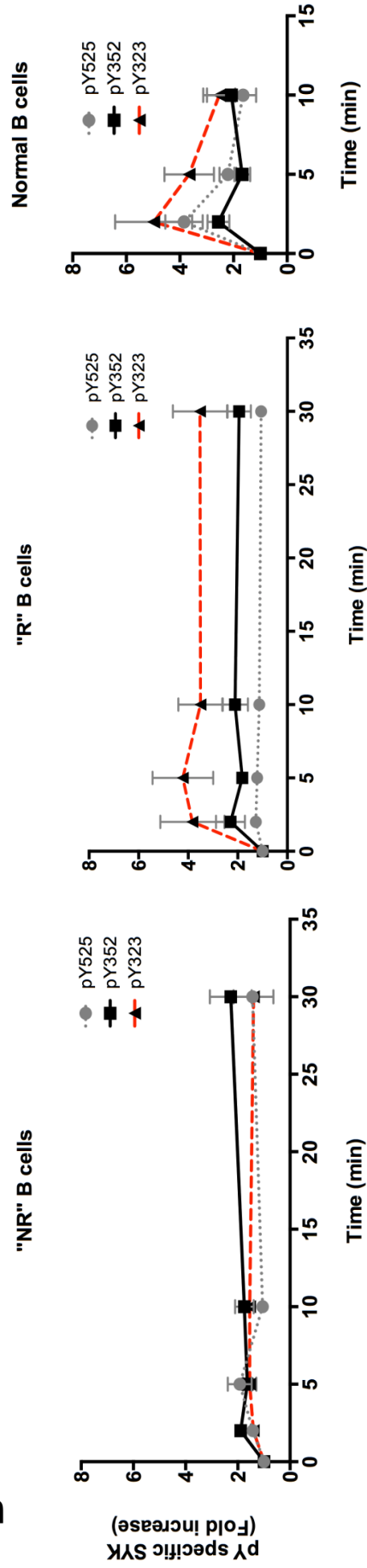


**Figure 2: Membrane localisation of BCR-mediated phosphorylated tyrosine Syk in responding CLL B cells.**

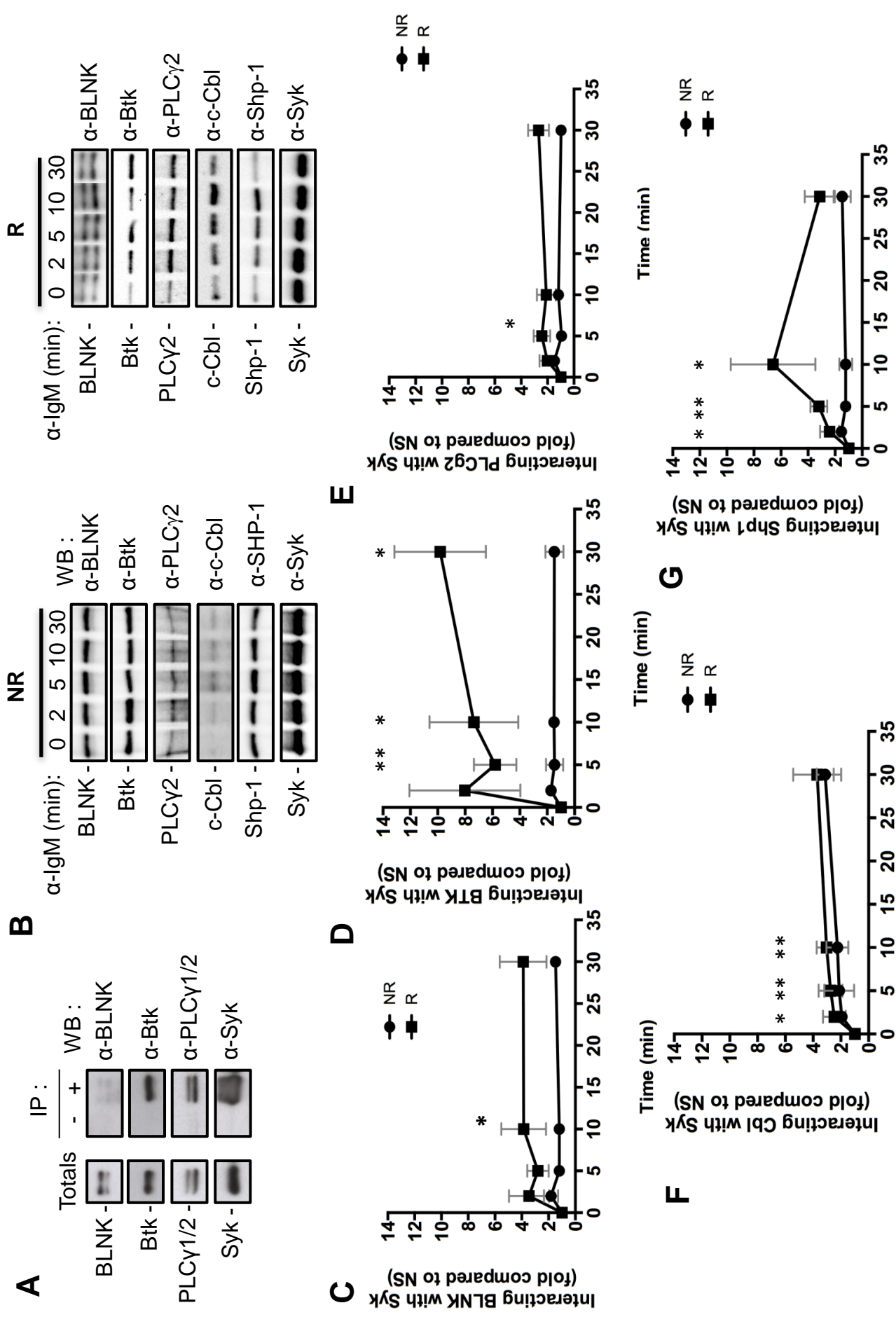
**A**

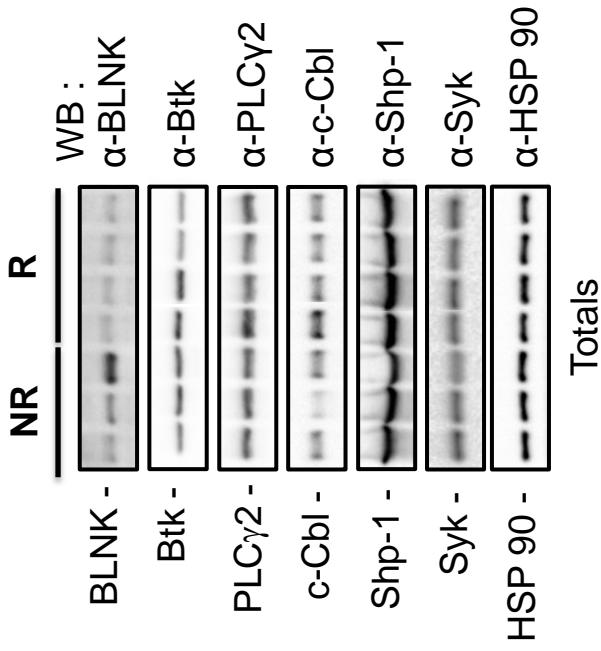
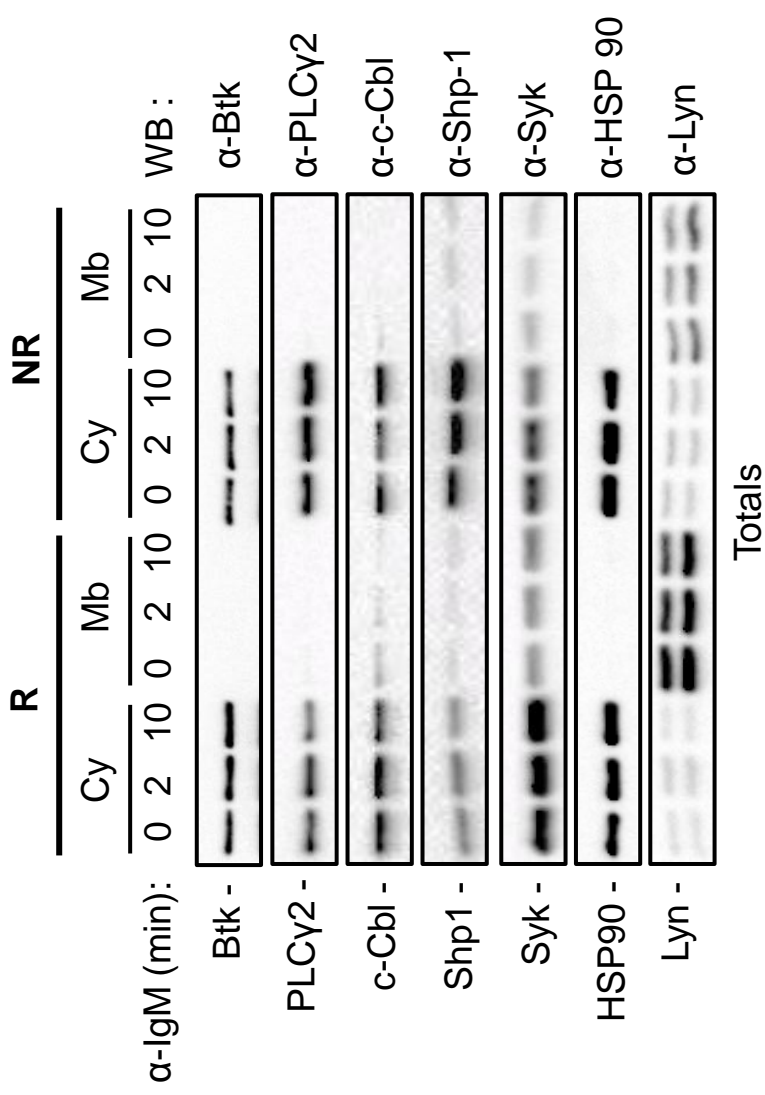


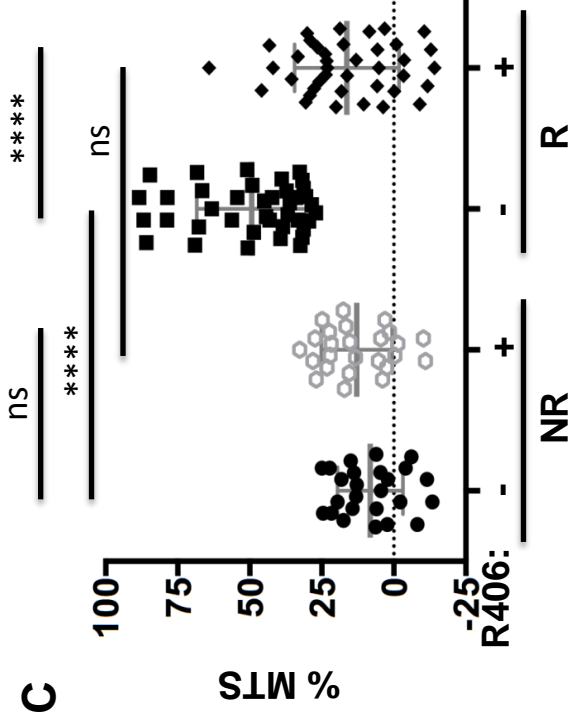
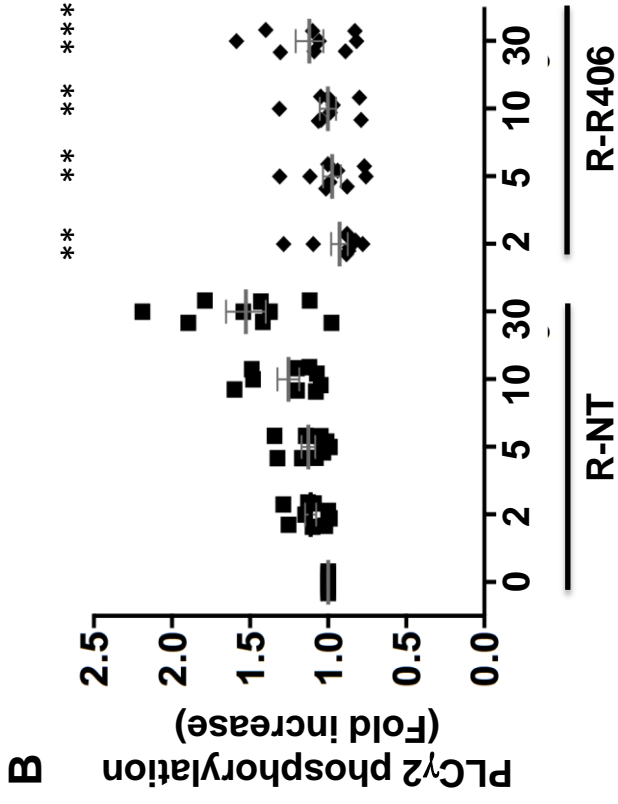
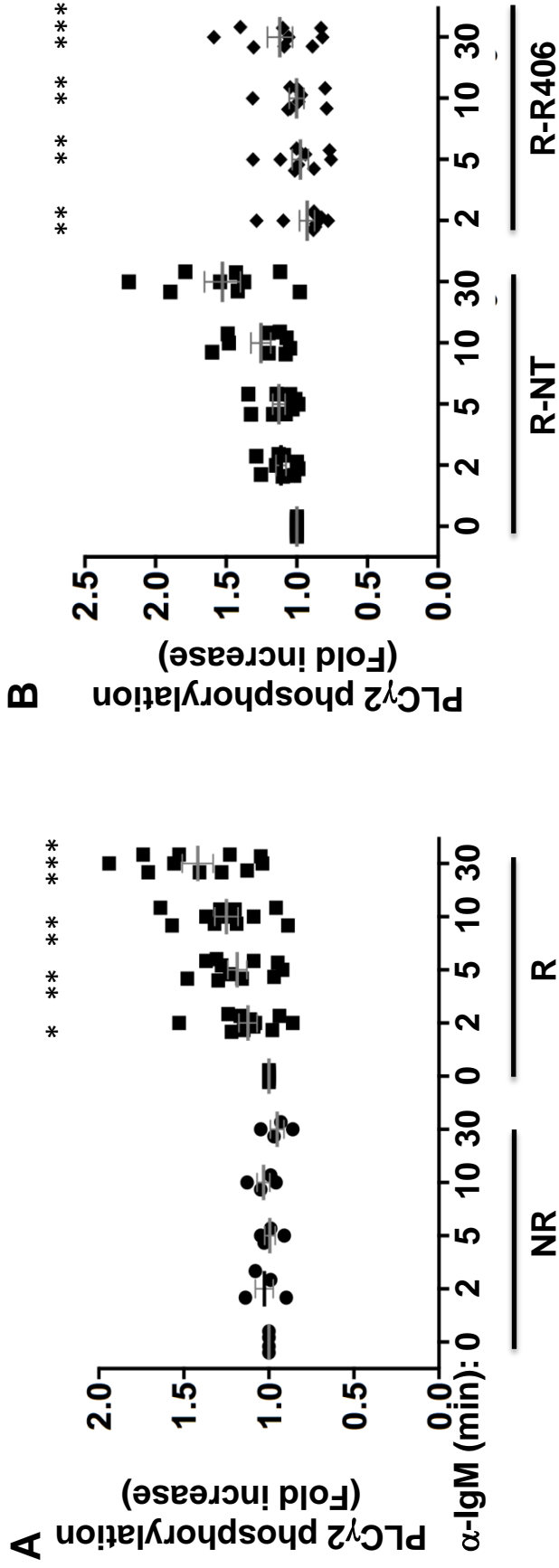
**B**



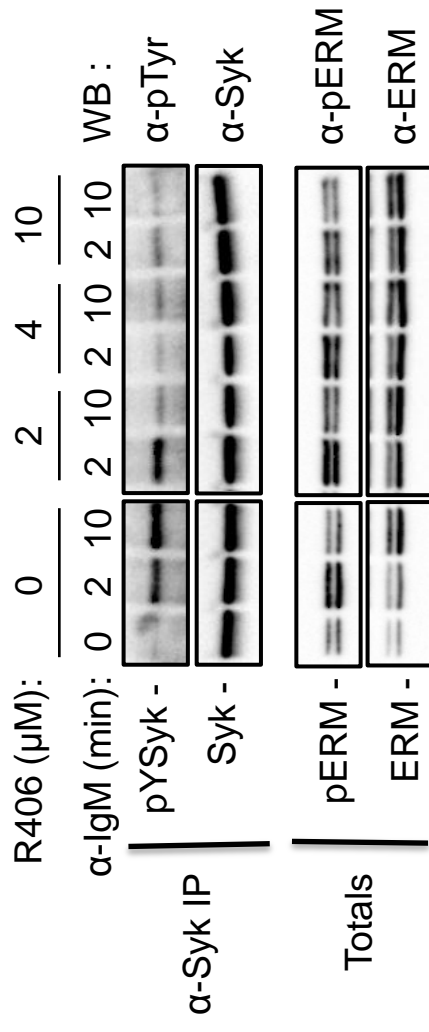
**Figure 3: Differential kinetics of phospho-tyrosine Syk species in response to BCR stimulation between CLL and normal B cells .**



**A****B****Figure 5: Syk's partner expressions and their subcellular distributions in CLL B cells.**



**Figure 6: R406 inhibition of Syk decreased PLC $\gamma$ 2 activation and survival in responding B cells but not in non-responding ones**



**Figure S1: Kinetics of BCR-dependent phospho-Syk in presence of various doses of R406 in responding CLL B cells**



## Résultats complémentaires

### Objectifs

Nos résultats montrent une augmentation de la phosphorylation globale de Syk dans les cellules R stimulées qui est expliquée en partie par l'augmentation du niveau de phosphorylation de la tyrosine 323 lors de la migration de Syk immuno-précipitée sur gel dénaturant en une dimension. Cependant, Syk est phosphorylée sur de nombreux résidus tyrosines en réponse à une stimulation antigénique [59, 62] et les anticorps commercialement disponibles ne couvrent pas le panel de phospho-tyrosines décrits sur cette kinase. Pour pallier à ce problème, nous avons choisi d'étudier les profils de phosphorylation de Syk immuno-précipitée après migration sur gel dénaturant en deux dimensions (2D). Cette approche devait nous permettre de comparer les profils de phosphorylation de Syk entre les cellules NR et R stimulées ou non et de déterminer la potentielle contribution d'autres résidus tyrosines dans l'augmentation globale de la phosphorylation de Syk dans les cellules R stimulées.

### Matériel et méthodes

**Immuno-précipitation.** Des cellules B de patients R et NR fraîchement purifiées ont été stimulées ou non avec un anti-IgM soluble (20 µg/mL; Jackson Immunoresearch) pendant 2 minutes. Elles ont ensuite été lysées dans un tampon Chaps 1% complété avec des inhibiteurs de protéases (voir manuscrit 2). Après détermination de la concentration protéique par un dosage BCA (Pierce), les lysats cellulaires ont été soumis à une immuno-précipitation effectuée avec un anticorps anti-Syk humain (Clone 4D10; BD Pharmingen) pendant la nuit à 4°C et sous agitation. Les complexes formés par Syk et ses formes phosphorylées liées à l'anticorps anti-Syk sont ensuite incubés en présence de billes Sepharose couplées à la protéine G (GE Healthcare) pendant 1 h puis ces complexes liés aux billes sont lavés 3 fois avec du tampon de lyse froid.

**Migration sur gels en 2 dimensions (2D).** Les billes associées aux complexes Syk sont re-suspendues dans un tampon d'IEF (IsoElectroFocalisation) (Chaps 4%, Triton X-100 0,24%, urée 7 M, thiourée 2 M) complété avec du DTT (10 mM) et des ampholytes pH = 3-10 (0,5 %). Les échantillons sont alors incubés en présence de strips (ReadyStrip IPG, pH 3-10 linéaire, 11cm;

BioRad) pendant 8 h puis les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique selon le programme suivant :

Etape	Voltage	Augmentation	Volt/Heure
1	50	Rapide	400
2	200	Rapide	200
3	1000	Linéaire	1000
4	5000	Linéaire	6000
5	5000	Rapide	5000
6	8000	Rapide	8000
7	100	Rapide	

A la fin de cette étape, les strips contenant les protéines focalisées sont incubés dans une solution d'équilibration (Urée 6 M, SDS 2 %, Glycérol 30%, Tris HCl pH = 7.4 50 mM) supplémentée en DTT (0,5 %) puis en iodoacétamide (100 mM) et Bleu de Bromophénol. Après les avoir scellées (Tris 25 mM, Glycine 19 mM et SDS 3,5 mM d'agarose 1%) au dessus d'un gel (Criterion TGX Any kD; BioRad), les strips sont soumises à une nouvelle migration dans une seconde dimension qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

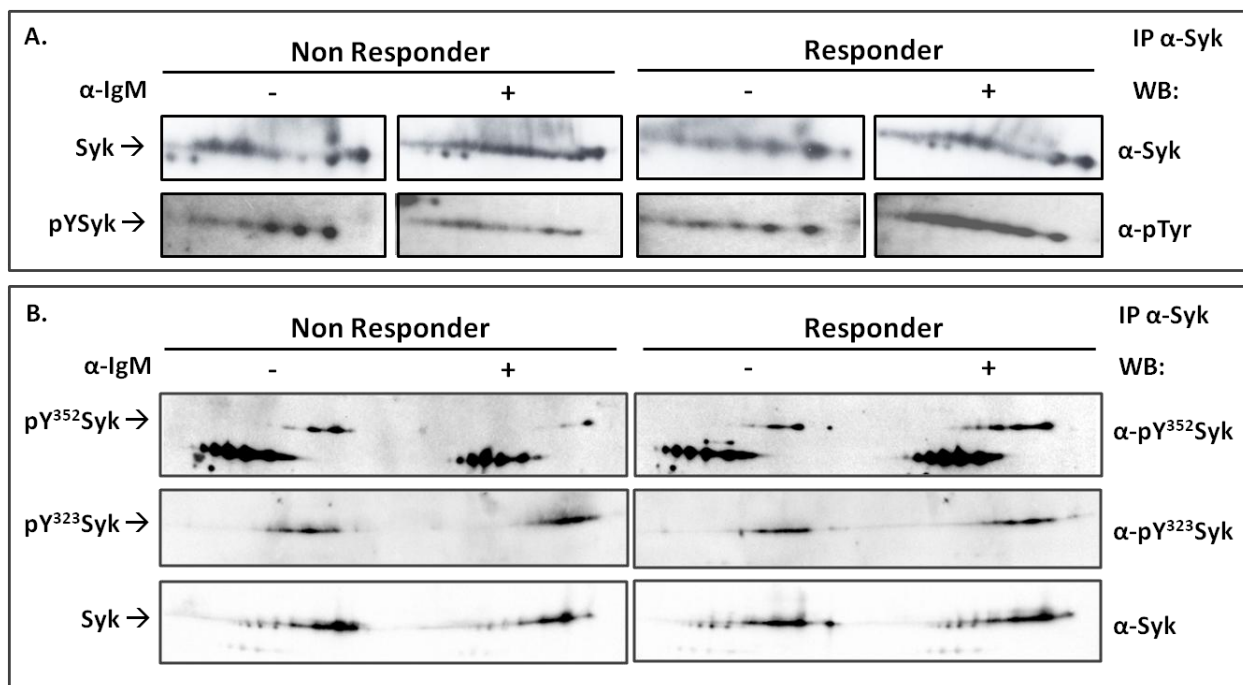
## Résultats

Alors que l'anticorps anti-Syk ne montre qu'une bande spécifique correspondant à la protéine Syk lors de la migration des lysats protéiques dans un gel dénaturant en une dimension (voir Figure 1E de l'article 1), il révèle plusieurs spots correspondant à des différentes formes modifiées de Syk lors de leur migration dans un gel dénaturant en 2 dimensions. En accord avec la littérature [59, 62], ces résultats suggèrent la présence de plusieurs sites de phosphorylation sur Syk. Un western blot de ces mêmes lysats avec l'anticorps anti-pTyr confirme que les différents spots correspondent à des trains de phosphorylation de Syk dans lesquels chaque spot représente l'ajout d'un groupement phosphate supplémentaire sur un résidu de la kinase. Ce déplacement vers les pH acides des formes phosphorylées de Syk est présent dans les cellules NR et R avec une augmentation de l'intensité du signal des spots dans les cellules R stimulées (Figure 31.A). Les western blots effectués pour les phospho-tyrosines spécifiques montrent que si les profils semblent différents pour les formes phosphorylées sur le résidu Y352 de Syk, ils semblent similaires pour les formes phosphorylées de Syk sur le résidu Y323 entre les cellules NR et R (Figure 31.B).

## Conclusion

L'ensemble de ces résultats supplémentaires indique que Syk est phosphorylée sur plusieurs résidus tyrosines à l'état basal et que de nouveaux sites sont phosphorylés après stimulation antigénique dans les cellules R. Cette augmentation du nombre et de l'intensité des spots serait expliquée par la modification du résidu tyrosine 352 des formes tyrosines phosphorylées de Syk mais pas par celle du résidu 323. Une étude par spectrométrie de masse des différents spots de Syk permettrait de déterminer quels acides aminés sont modifiés.

## Figure



**Figure 31. Profils de phosphorylation de Syk différentiels entre cellules NR et R après stimulation antigénique.** Les cellules NR (n = 2) et R (n = 2) sont stimulées (+) ou non (-) pendant 2 minutes avec un anticorps anti-IgM (α-IgM) puis les lysats cellulaires sont soumis à des immunoprécipitations anti-Syk (IP α-Syk). Après une IEF suivie d'un gel SDS-PAGE, les complexes immunoprécipités sont analysés pour A) la protéine Syk (WB anti-Syk) et pour les formes modifiées par phosphorylation sur les résidus tyrosines (WB : anti-pTyr), et en B) pour les formes modifiées spécifiques sur le résidu tyrosine 352 (WB : pY<sup>352</sup>Syk) ou sur le résidu tyrosine 323 (WB : pY<sup>323</sup>Syk).



## MANUSCRIT 3 : Implication des PKD dans l'internalisation du CXCR4 après activation du BCR des cellules B-LLC

Le 3<sup>ème</sup> objectif de mon travail de thèse consiste à caractériser les intermédiaires de signalisation activés en aval du BCR et aboutissant à l'internalisation du CXCR4 dans les cellules B de LLC. Il est effectué en collaboration avec Stéphane Saint-Georges, qui était en formation doctorale au sein de l'Unité U978 et aujourd'hui diplômé. Des travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire [214] montrent qu'une stimulation du BCR entraîne une diminution de l'expression membranaire du CXCR4 dans les cellules B-LLC chez certains patients. Cette diminution est associée à une perte des capacités de migration en réponse à une stimulation du SDF1 mesurée *in vitro* et est liée à la survie sans progression des patients LLC. L'ensemble de ces données suggère que l'internalisation du CXCR4 après activation du BCR perturbe le trafic *in vivo* des cellules B-LLC chez les patients évolutifs et participe ainsi à leur accumulation au sein du microenvironnement ganglionnaire. Cependant, peu de données décrivent les mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation du CXCR4 en réponse à une stimulation du BCR dans les cellules B-LLC.

Des échantillons de sang frais issus de patients LLC non traités, après leur consentement éclairé, ont été obtenus par le laboratoire d'Hématologie Biologique (Pr. F. Cymbalista, Hôpital Avicenne) et l'Unité de Recherche Clinique (URC, Pr. V. Lévy, Hôpital Avicenne). Une mesure par cytométrie en flux de la diminution de l'expression membranaire du CXCR4 après stimulation antigénique de 24 heures distingue les patients répondeurs des patients non-répondeurs en terme de pourcentage d'internalisation du CXCR4. Un co-traitement des cellules B de LLC avec un panel d'inhibiteurs ciblant les membres de la famille PKC/PKD a permis d'identifier les intermédiaires de la signalisation du BCR impliqués dans l'internalisation du CXCR4. Les expressions transcriptionnelle et traductionnelle des isoformes des PKD ont été mises en évidence par Q-PCR et par western blot, respectivement. Les expressions des phospho-PKD, du CXCR4 et phospho-CXCR4 ont été détectées par western blot et immunofluorescence en utilisant les anticorps appropriés.

Par l'utilisation de composés chimiques ciblant différentes isoformes de PKC/PKD (Gö6983, Gö6976, GF109203X et CID755673), nos résultats montrent que la diminution de l'expression membranaire du CXCR4, suite à une stimulation du BCR, est dépendante des PKDs et non des PKCs. Cette internalisation du CXCR4 est médiée et corrélée au niveau de phosphorylation des résidus sérines 744 et 748 des PKDs qui permettent l'activation des PKDs bloquée par l'inhibiteur spécifique, le CID. De plus, nos données révèlent que le CXCR4 est une cible spécifique des PKDs en phosphorylant ce récepteur sur des résidus sérines impliqués dans son internalisation. Enfin, nos résultats démontrent que l'endocytose du CXCR4 est dépendante de l'activité des PI3Ks, et notamment de la PI3K- $\delta$ , située en amont des PKDs. L'ensemble de ces données expliquerait en partie les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'accumulation des cellules de B de LLC dans les ganglions des patients évolutifs.

Ces travaux font l'objet d'un manuscrit en cours de révision dont je suis le deuxième auteur. Ils montrent pour la première fois l'implication des PKD dans l'internalisation du CXCR4 après stimulation antigénique des cellules B-LLC. Ces données révèlent comment des altérations de l'activation des intermédiaires de la signalisation du BCR impliqués dans la migration cellulaire participent à la physiopathologie de la LLC. Elles mettent en évidence des biomarqueurs fonctionnels de l'évolutivité de la LLC (PI3K- $\delta$ , PKD et CXCR4) et suggèrent PKD2/3 comme des cibles thérapeutiques potentielles. De plus, elles contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes d'action du Cal-101 (ou Idelalisib) qui entraîne une redistribution des cellules B-LLC et une diminution du volume ganglionnaire dans les essais cliniques.

**Protein Kinase D mediates BCR-driven CXCR4 down-regulation  
in Chronic Lymphocytic Leukaemia**

Stéphane Saint Georges<sup>1,2</sup>, Maude Quettier<sup>1,2</sup>, Vanessa Laurienté<sup>1,2</sup>, Lionel Guittat<sup>1,2</sup>, Vincent Lévy<sup>3</sup>, Florence Ajchenbaum-Cymbalista<sup>1,2,4</sup>, Nadine Varin-Blank<sup>1,2,&</sup>, Christine Le Roy<sup>1,2,†,&</sup> and Dominique Ledoux<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>INSERM U978, Bobigny, France

<sup>2</sup>Sorbonne Paris Cité, Université Paris 13, Labex “Inflamex”, UFR SMBH, Bobigny, France

<sup>3</sup>Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Unité de Recherche Clinique, Bobigny, France

<sup>4</sup>Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d’Hématologie Biologique, Bobigny, France

† CLR and DL are co-seniors authors

& CLR and NVB are co-corresponding authors:

Dr. Christine Le Roy: UMR 978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 73 90; Fax: 33 1 48 38 73 69; E-mail: [christine.le-roy@inserm.fr](mailto:christine.le-roy@inserm.fr)

Dr. Nadine Varin-Blank: UMR 978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 88 51; Fax: 33 1 48 38 73 69; E-mail: [nadine.varin@inserm.fr](mailto:nadine.varin@inserm.fr)

Running title: **PKD mediates BCR-dependent CXCR4 decrease in CLL cells**

Keywords: **CLL, B-cell receptor, CXCR4, Protein kinase D**

Financial supports: **INSERM, University Paris 13, Labex Inflamex n°ANR11 IDEX00502, Fondation de France, Société Française d’Hématologie, Ligue Nationale Contre le Cancer.**

Disclosure and Conflicts of Interests: **There are no conflicts of interest to declare by any of the authors.**

Text word count: 4955/5000; Abstract word count: 227/250; 7 figures and 0 table; 4 supplementary figures and 2 supplementary tables; 48/50 references

## Abstract

In chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL), malignant B cell infiltration of lymph nodes is continuously observed for patients with progressive disease. Previously, we demonstrated that B-cell receptor (BCR) engagement of CLL cells resulted in CXCR4 internalization that was correlated with patient shorter progression-free survival. In the present work, we characterized BCR signalling effectors involved in CXCR4 endocytosis in CLL cells. By using chemical compounds with differential Protein kinase C (PKC)/Protein kinase D (PKD) inhibitory specificities, we found that PKDs, and not PKCs, were implicated in BCR-mediated CXCR4 decrease. Transcriptional and translational analyses of PKD isoforms revealed that PKD2 and PKD3 were expressed in CLL cells. Interestingly, BCR engagement enhanced Serine<sup>744/748</sup> PKD phosphorylation levels that were correlated with CXCR4 endocytosis. This initial phosphorylation resulted into increased PKD activity evidenced by phosphorylation at Serine<sup>916</sup>, which was blocked by PKD inhibitor. In turn, we characterized CXCR4 as a specific PKD target by phosphorylating Ser<sup>324/325</sup> that are involved in CXCR4 internalization. CLL cells unable to phosphorylate PKD and to down-regulate CXCR4 in response to BCR engagement remained functionally responsive to other signals. Finally, inhibition of PI3K- $\delta$  revealed that the kinase is an upstream activator of PKD in BCR signalling pathway. Thus, our results demonstrated that BCR-dependent CXCR4 internalization relied on functional PI3K- $\delta$  and PKD2/3 activation in CLL cells from progressive patients and targeting this pathway is highly relevant to lymph node infiltration.



## **Introduction:**

Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL), the most common adults neoplasm in Western countries presents with a heterogeneous clinical course from indolent to progressive cases that need treatment (1-5). Despite comprehensive advances on CLL biology, the neoplasm remains incurable with standard therapy. Clinical use of recent signalling inhibitors raise promising improvement for treatment, but their mechanisms of action are still incompletely understood.

Characterized by a progressive accumulation in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes, mature CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> CLL cells rapidly undergo apoptosis when cultured *in vitro*, suggesting a contribution of the microenvironment to the survival and proliferation *in vivo*. A current model proposes that CLL cells, which retain their sensitivity to external signals, cycle continuously between a quiescent state in the periphery and a proliferative state in the tissues (6). Notably, antigen-driven signals are involved in the pathogenesis and the progression of the malignancy (7-11) with a particular occurrence within the lymph node microenvironment (12, 13). Antigens-binding to their receptors (BCR), initiates a set of signalling cascades leading to activation of protein kinases such as Spleen- (Syk) and Bruton - (Btk) tyrosine kinases or Phosphatidyl 3-delta kinase (PI3K- $\delta$ ). Targeting of these kinases, notably PI3K- $\delta$  (14, 15), prevents malignant B cells from generating survival signals in response to the tissue microenvironment and allows peripheral cell redistribution (16). Interestingly, inhibitors of Syk, Btk or PI3K- $\delta$  (17) also impair CLL cell migration induced by pro-survival chemokines such as CXCL12 upon binding to its cognate receptor CXCR4 (16). Expressed at high levels at the surface of peripheral blood CLL cells, CXCR4 mediates CLL cell chemotaxis and migration beneath and underneath CXCL12 secreting stromal cells (16). In contrast, CXCR4 expression is weak at the cell surface in lymphoid tissues (13), likely due

to a ligand-dependent internalisation of the receptor (10), which involves its carboxy-terminal serine rich domain bound to various endocytic proteins (18-20). Interestingly, in T cells, phorbol ester-induced CXCR4 endocytosis is mediated by a Ser/IleLeu motif and sensitive to PKC inhibitors (18).

Initially identified as PKC $\mu$ , protein kinases D1 (PKD1), as well as PKD2 and PKD3, form a new serine kinase subfamily (21-23). In addition to the serine kinase domain, the three proteins share two C1-domains, which bind diacylglycerol and phorbol esters (PMA) and an auto-inhibitory PH-domain (24). Upon hormonal and growth factors stimuli, both PKC-dependent and -independent activation of PKD members (25, 26) occur at serine residues: Ser<sup>744</sup> and Ser<sup>748</sup> in the activation loop of the kinase domain, Ser<sup>916</sup> in the C-terminal region of PKD1 and PKD2; amino acids are numbered according to the sequence of murine PKD1. Phosphorylation of both Ser<sup>744/748</sup> is required for PKD activation and followed by trans- or auto-phosphorylation at Ser<sup>916</sup> (27). In adult mice, PKD2 is selectively expressed in murine lymphoid cells and controls their functions during adaptive immune responses (23). An *in situ* study in reactive lymph nodes and lymphoid tumours revealed that expression levels and auto-phosphorylation of PKD2 were similar between neoplastic cells and normal counterparts (28).

We have previously shown that *in vitro* BCR engagement induces plasma membrane CXCR4 decrease in peripheral blood CLL cells from progressive patients. Receptor internalization was related to decreased cellular chemotaxis towards CXCL12 gradient and correlated with shorter patients progression-free survival (10). In this study, we addressed the molecular mechanisms underlying BCR-dependent CXCR4 down-regulation. We demonstrated that a PKD phosphorylation/activation in response to BCR stimulation involving PI3K- $\delta$  is required for CXCR4 phosphorylation and down-regulation in CLL cells

from progressive patients. Therefore, PKD inhibition presents as a new therapeutic alternative in CLL.

## **Materials and methods:**

### **CLL cell isolation and culture**

CLL blood samples were obtained from untreated patients, after informed consent and validation by the local research ethics committee from the Avicenne Hospital (Bobigny, France), in accordance with the Declaration of Helsinki. CLL B cells were purified by negative selection using RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies). Purity was assessed as previously described (7). CLL B cells were cultured fresh or after viable thawing in RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine. CLL B cells were stimulated at  $2 \times 10^6$  cells/mL in 24-well plates coated with rabbit anti-IgM antibody (10 µg/mL; Jackson Immunoresearch). Prior to BCR stimulation, lymphocytes were incubated or not with Gö6976, Gö6983 (Calbiochem), GF109203X, LY294002 (Sigma-Aldrich), CAL101 (Selleckchem) or CID755673 (Tocris Bioscience). Human embryonic kidney 293T and human hepatocellular carcinoma HepG2 cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine.

### **Flow cytometry analysis**

CD5, CD19 and CXCR4 membrane expression levels were analysed by flow cytometry (FACS-CANTO II; Becton Dickinson) after labelling with the indicated conjugated monoclonal antibodies (mAbs): PE-Cy7-anti-CD5 (clone L17F12), APC-Cy7-anti-CD19 (clone SJ25C1) and APC-anti-CXCR4 (clone 12G5) or the respective control IgG isotype

mAbs (BD Biosciences). Data acquisition and analysis were performed using BD FACSDiva software. After 24 hours of BCR stimulation or 15 minutes treatment with 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Cell Signaling Technology), cell viability (labelling with PO-PRO-1 Iodide; Life Technologies) and plasma membrane CXCR4 expression levels were determined in CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> CLL cells. A threshold was arbitrarily set up case-by-case on untreated cells to include at least 90 % of CXCR4<sup>high</sup> cells. BCR- and PMA-dependent CXCR4 membrane decrease was calculated as follows:

$$\text{CXCR4 decrease} = 100 - ((\% \text{ CXCR4}^{\text{high}} \text{ after IgM stimulation} \times 100) / (\% \text{ CXCR4}^{\text{high}} \text{ before IgM stimulation}))$$

### **Immunoblot analysis**

After BCR stimulation or PMA treatment, total B cell contents were extracted using 1% Nonidet P-40 lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.5 mM EDTA, supplemented with proteases inhibitors (Sigma-Aldrich). After determination of protein concentration using the BCA method (Pierce), proteins were separated on SDS-PAGE and analysed by western blotting with the appropriate antibodies: anti-phospho-Erk1/2, anti-PKD1/2, anti-phospho-Ser<sup>744/748</sup> PKD, anti-phospho-Ser<sup>916</sup> PKD, anti-HSP90 (Cell Signaling Technology), anti-PKD2 (Millipore), anti-PKD3 (Bethyl Laboratories, Inc.), anti-CXCR4 (Abcam), anti-phospho-Ser<sup>339</sup> CXCR4 (Abcam), anti-phospho-Ser<sup>324/325</sup> CXCR4 (ECM Biosciences) and anti- $\alpha$ -Tubulin (Sigma Aldrich). Detection was achieved after HRP Conjugate secondary antibody labelling (Biorad) using chemi-luminescence (ECL, Pierce) and visualized using the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

### **RNA isolation, reverse transcription and Q-PCR.**

Total RNAs were isolated from cells using Trizol reagent (Invitrogen), purified (QIAGEN) and quantified by spectrophotometry. Total RNAs (1  $\mu$ g) were retro-transcribed using MMLV reverse transcriptase. Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was performed using a 7500 SDS Thermal Cycler (Applied Biosystems). Complementary DNAs, 3.2  $\mu$ M gene-specific sense and anti-sense primers, as well as specific FAM-MGB probes (Applied Biosystems) (Supplementary Table S1) and PCR Master Mix were mixed in a 25  $\mu$ L volume. The reactions were performed as follow: 40 cycles at 98°C for 15 seconds and 58°C for 60 seconds. Each experiment was repeated in duplicates. Cyclophilin was used as internal gene control. Relative quantification of each PKD gene expression was determined using the  $\Delta$ Ct method and values are expressed as  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  or  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

### **Immunofluorescence staining**

As described previously (11), CLL cells were fixed, permeabilized and incubated with anti-mouse CXCR4 and anti-rabbit pSer<sup>324/325</sup> CXCR4 antibodies followed by Alexa 488 coupled secondary anti-rabbit and Alexa 546 coupled secondary anti-mouse Abs (Jackson ImmunoResearch). Images were acquired on a spinning disk confocal microscope High Content Bioimager BD Pathway 855 using Attovision Software (Becton Dickinson).

### **Data analysis and statistics**

Data and statistical analyses were performed using the GraphPad program (Paired  $t$  test and linear regression, GraphPad Software Inc).

## Results:

### **PKDs mediate BCR-dependent CXCR4 down-regulation in CLL cells.**

The carboxyl-terminal sequence of human CXCR4 exhibits serine residues (324, 325, 338 and 339) that are involved in PMA-induced endocytosis in T cells and are sensitive to PKC inhibitors (18-20). Interestingly, portion of this sequence (<sup>320</sup>VSRGSS<sup>325</sup>) also identifies as a PKC $\mu$ /PKD1 phosphorylation consensus site (V/LXRXXS/T) (24). Therefore, we evaluated the functional impact of PKC $\mu$ /PKD1 on CXCR4 decrease upon antigenic stimulation by chemical targeting of PKC and PKD families' members (Gö6983, Gö6976, GF109203X and CID755673) prior to CLL cell stimulation.

As previously demonstrated (10), sustained BCR stimulation (anti-IgM) of CLL cells led to a large decrease of membrane CXCR4 in BCR-responsive cells (Fig. 1A-C, untreated and Supplementary Table S2). Treatment with the pan-PKC inhibitor Gö6983, which poorly inhibits PKD (29), or the PKC inhibitor GF109203X that inhibits classical PKC isoforms but not PKD (30) did not prevent CXCR4 decrease upon anti-IgM ligation (Fig. 1A-B), in contrast with their expected inhibitory effect on PMA-dependent ERK1/2 phosphorylation (Supplementary Fig. S1 and (31)). At the opposite, incubation of the cells with Gö6976, a selective inhibitor of classical PKC isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\gamma$ ) and purified PKD (32), blocked almost completely CXCR4 decrease (Fig. 1A-B). To verify the functional involvement of PKDs, we used a potent and selective PKDs inhibitor, the CID755673 molecule (33). The optimal CID755673 concentration, allowing a maximal effect on anti-IgM-dependent CXCR4 decrease with minimal deleterious effect on CLL cell viability, was first determined (Supplementary Fig. S2). A 50  $\mu$ M concentration strongly prevented BCR-mediated CXCR4 decrease without affecting cell viability (Fig. 1C). These data suggest that

membrane CXCR4 decrease in response to sustained BCR stimulation does not involve PKCs but rather points out PKDs as the effectors of this signalling cascade in CLL cells.

To confirm the functional implication of PKD rather than PKCs, a series of 16 BCR-responsive CLL cell samples were treated with the various PKC or PKD inhibitors, stimulated with anti-IgM and the percentage of CXCR4 decrease analysed using flow cytometry. Figure 2A-C shows that Gö6976 and CID755673 had strong inhibitory effects whereas both Gö6983 and GF109203X did not.

Altogether, these data demonstrate the functional implication of PKDs in the plasma membrane modulation of CXCR4 in BCR-stimulated CLL cells.

### **PKD2 and PKD3 are expressed in CLL B cells**

*In vivo* studies revealed that PKD2, but not PKD1, is selectively expressed in murine lymphoid tissues (23). Similar PKD isoforms expression pattern was found in tonsils and reactive lymph nodes from patients with malignant lymphomas (28). However, there is, so far, no evidence for a functional role of PKD in CLL pathophysiology. Therefore, we first investigated expression levels of the 3 PKD isoforms in CLL cells by quantitative PCR (Q-PCR) and Western blot analysis.

Primers were designed to amplify specific regions of the 3 human PKD genes. After verifying the PCR products by gel electrophoresis and sequencing (data not shown), transcript levels for PKD1, 2 and 3 were determined in 15 CLL B cell samples and in normal counterpart. As shown in Fig. 3A, both malignant and normal B cells expressed PKD2 and PKD3 mRNA although to variable extent but no PKD1 mRNA was detected. This finding was translated into protein expression levels. Western blotting analysis with anti-PKD1/PKD2, -PKD2 and -PKD3 antibodies of B cell lysates from 6 CLL patients confirmed

the variable expression of PKD2 and PKD3 only. In contrast, the 3 isoforms were revealed in 293T cells used as positive controls (34) (Fig. 3B).

Altogether, these data demonstrated that PKD2 and PKD3, but not PKD1, are detected in CLL cells.

### **BCR engagement leads to specific PKD phosphorylation correlated with CXCR4 down-regulation in CLL responsive cells.**

Since extracellular stimuli rapidly result in PKDs phosphorylation (22), we next evaluated, in the context of CLL cells, their phosphorylation status upon BCR-triggering using antibodies that recognize either phospho-Ser<sup>744/748</sup> (present in all PKD isoforms) or phospho-Ser<sup>916</sup> (present in PKD1 and PKD2 only).

Western blot analysis of phospho-Ser<sup>744/748</sup> PKD levels in 6 BCR-responsive cell samples revealed a strong increase of phosphorylation upon anti-IgM stimulation (Fig. 4A). The phosphorylation remained detected after longer stimulatory time course (24 hours, Supplementary Fig. S3). Additionally, this raise of the phosphorylation status significantly correlated ( $p=0.017$ ;  $r^2=0.8$ ) with the decrease of surface CXCR4 (as determined by flow cytometry) observed during anti-IgM-triggering (Fig. 4B).

As shown in Fig. 4C, anti-IgM stimulation for 30 minutes enhanced not only Ser<sup>744/748</sup> but also Ser<sup>916</sup> phosphorylation levels of PKDs. Similar phosphorylation patterns on Ser<sup>744/748</sup> and Ser<sup>916</sup> were observed upon PMA treatment of the cells (Fig. 4C).

Since the Ser<sup>916</sup> phosphorylation of PKD relates to its activation (35), we sought investigating the impact of CID755673 upon BCR engagement (Fig. 4D). Results demonstrated that the PKD inhibitor weakly affected anti-IgM dependent phospho-Ser<sup>744/748</sup> PKD status, but strongly interfered with phosphorylation on Ser<sup>916</sup>, as previously described (33).



Altogether, these data demonstrated that BCR engagement leads to PKD phosphorylation on both Ser<sup>744/748</sup> and Ser<sup>916</sup> in CLL responsive cells. Since the phosphorylation correlates with CXCR4 down-regulation, and is blocked by the CID755673 inhibitor, these results likely implicate phospho-PKD2 as a BCR signalling intermediate in CXCR4 internalisation of the malignant cells.

### **BCR-unresponsive CLL cells are still reactive to PMA treatment.**

As we previously demonstrated (10), several CLL B cell samples exhibit limited (< 5%) to not at all CXCR4 decrease in response to sustained BCR stimulation; those were termed BCR-unresponsive cells (Fig. 5A, left dot plots and Supplementary Table S2). Treatment of these cells with chemical inhibitors targeting PKCs or PKDs prior to BCR stimulation did not modify cell surface CXCR4 levels (Fig. 5A, right dot plots and Supplementary Fig. S4). Accordingly, analysis of the phosphoSer<sup>744/748</sup> PKD content of three BCR-unresponsive cells showed only scarce increase upon anti-IgM stimulation (Fig. 5B) as compared to BCR-responsive cells (Fig. 4A). In contrast, BCR-unresponsive cells retained their capacity to down-regulate membrane CXCR4 expression upon PMA stimulation (Fig. 5C), that was associated with a striking increase of phospho-Ser<sup>744/748</sup> and -Ser<sup>916</sup> PKD levels as compared to untreated cells (Fig. 5D). These data confirmed the functionality of the cells in terms of PKD phosphorylation and CXCR4 down-regulation, despite their lack of response to BCR-triggering.

### **PKD activity is required to CXCR4 phosphorylation in CLL cells**

CXCR4 internalization upon CXCL12 binding (19, 36) involves at least phosphorylation of 4 serine residues (324, 325, 338 and/or 339). Since Ser<sup>325</sup> residue is part of

a potential PKD phosphorylation consensus site (VSRGSS<sup>325</sup>), we hypothesized that BCR-dependent PKD activation might manage Ser<sup>325</sup> CXCR4 phosphorylation.

To test this hypothesis, CLL cells were stained for endogenous total and phospho-Ser<sup>324/325</sup> CXCR4 and then visualized by immunofluorescence by confocal microscopy. Results revealed an increased phospho-Ser<sup>324/325</sup> CXCR4 staining at the plasma membrane of stimulated cells as compared to unstimulated ones (Fig. 6A). Moreover, western blot analysis confirmed that anti-IgM stimulation increased remarkably phospho-Ser<sup>324/325</sup> CXCR4 levels, without affecting phospho-Ser<sup>338/339</sup> or total CXCR4 levels (Fig. 6B). As expected, BCR stimulation also enhanced phospho-Ser<sup>744/748</sup> - but not total-PKD levels.

Interestingly, PKD inhibition with CID755673 impeded by 60% CXCR4 Ser<sup>324/325</sup> phosphorylation (Fig. 6C). Thus, in agreement with our *in silico* analysis for kinase-specific phosphorylation sites, these results suggested that the serine 325 residue is a PKD target upon BCR engagement.

Taken together, these data demonstrated that BCR engagement induces PKD-dependent CXCR4 phosphorylation on Ser<sup>325</sup> that mediates its down-regulation in CLL cells from progressive patients.

### **PKD is an effector of PI3K- $\delta$ in anti-IgM-driven CXCR4 down-regulation.**

Reports indicate that BCR engagement allows PI3K recruitment, which in turn activates PKD in mouse B cells (37). Likewise, several clinical trials are presently targeting PI3K- $\delta$  in CLL disease (14, 15). Therefore, we evaluated whether PI3K inhibitors might impede PKD phosphorylation upon antigenic stimulation in BCR-responsive CLL cells.

Pharmacological inhibition of PI3Ks using LY294002 (a pan-PI3K inhibitor (38)) or CAL101 (a PI3K- $\delta$  specific inhibitor (14)) substantially reduced the phospho-Ser<sup>744/748</sup> levels

of PKD upon anti-IgM stimulation (Fig. 7A), suggesting that PI3K- $\delta$  was an upstream kinase of PKD in the BCR signalling cascade of leukemic cells.

Functionally, PI3K inhibitors also impacted BCR-dependent CXCR4 decrease in stimulated CLL cells (Fig. 7B). These results were confirmed by individual quantification of several CLL cell samples treated with LY294002 (n=10, Fig. 7C left) or CAL101 (n=6, Fig. 7C right).

Collectively, these data reveal that BCR triggering allows PI3K- $\delta$ -dependent PKD phosphorylation leading to the down-regulation of cell surface CXCR4 in BCR-responsive cells.

### **Discussion:**

We have previously shown that *ex-vivo* BCR engagement leads to a decrease of plasma membrane CXCR4 expression in CLL cells from patients with unfavourable prognostic factors and at risk of disease progression only (10). In the current study, we deciphered the underlying functional mechanisms and provided evidences for a role of the PKD serine kinases in BCR-mediated CXCR4 down-regulation in CLL cells.

Despite our current understanding of PKD functions in response to various stimuli in normal and pathological models (21-23), little is known so far about the expression and the role of the three PKD isoforms in the context of CLL. Our data demonstrate that all CLL cells co-express PKD2 and PKD3 in absence of measurable PKD1. This pattern of expression is compatible to those described in human lymphocytes in reactive lymphoid tissues and in neoplastic cells of lymphoid origin (28). Since many adult tissues co-express distinct PKD isoforms that might exert redundant functions, we sought to determine whether PKD2 and/or PKD3 were involved in BCR-dependent CXCR4 decrease in CLL B lymphocytes. One discriminating feature between PKD2 and PKD3 sequences is the specific presence of Ser<sup>916</sup>

residue in the PKD2 isoform; this residue is considered as a site of auto-phosphorylation reflecting further activation once PKD is primarily phosphorylated (21-23, 35). Thus, the constitutive and enhanced phospho-Ser<sup>916</sup> PKD observed upon sustained anti-IgM stimulation might be attributed to active PKD2 in CLL cells. Apart from the increase of phospho-Ser<sup>916</sup>, anti-IgM stimulation of CLL cells also resulted in phosphorylation of Ser<sup>744</sup> and/or Ser<sup>748</sup> residues positioned in the activation loop of the PKD2 and PKD3 kinase domains. Nevertheless, these sites of phosphorylation are not distinctive between the two PKD isoforms. The enhanced phospho-Ser<sup>744/748</sup> levels were correlated to membrane CXCR4 disappearance in a series of BCR-responsive cell samples. Together with our previous report on the correlation between CXCR4 decrease levels and the progression free survival of the patients (10), it is tempting envisioning that phospho-Ser<sup>744/748</sup> of PKD2/3 might serve as a potential biomarker of CLL progression.

We demonstrate the functional implication of PKD2/3 in sustained BCR-induced CXCR4 down-regulation in CLL cells first by using a combination of two inhibitors that have different PKC/PKD inhibitory specificities but also with a selective PKD inhibitor, CID755673 (29, 30, 32, 33). CID755673-treated cells showed upon sustained BCR stimulation a striking inhibition of CXCR4 internalisation with a strong decrease of phospho-Ser<sup>916</sup> PKD2 levels, identifying PKD2 as the effector of the cascade in BCR-responsive cells. Interestingly, in BCR-unresponsive cells that are unable to down-regulate CXCR4 upon BCR engagement, a strong increase of phospho-Ser<sup>916</sup> (as well as phospho-Ser<sup>744/748</sup>) was observed under PMA treatment, indicating that PKD2 was still functional in these cells. This suggests that BCR-unresponsive CLL cells display a functional deficiency at the level of the BCR signalosome (11) rather than a defect of downstream effectors such as PKD.

In order to identify BCR signalling intermediates of PKD activation in CLL cells, we evidenced the functional implication of PI3Ks, but not PKCs, in this process. Despite the

already described PKC involvement in the immediate control of PKD activity upon BCR activation (39-41) (data not shown), a PKC-independent pathway resulting in PKD activation was also observed in response to sustained stimulation of the bombesin or endothelin receptors in Swiss3T3 cells and neonatal cardiomyocytes, respectively (26, 42). Independence towards PKC of BCR-mediated CXCR4 down-regulation might rely on the depletion of PKC protein content without affecting PKD protein level as the result of a continuous BCR activation in CLL cells. This hypothesis is supported by an observation in human corneal epithelial cells where prolonged PMA treatment allowed complete depletion of PKC- $\alpha$ , - $\beta$ I, - $\beta$ II, - $\delta$  and - $\epsilon$  while PKD1 content was not altered (43, 44).

By using two inhibitors targeting PI3K, our work demonstrated the functional implication of the PI3K- $\delta$  isoform. PI3K- $\delta$  is a biomarker of specific interest since *i*) PI3K- $\delta$  is abundantly expressed and constitutively activated in CLL cells (45) and *ii*) the orally bioavailable form of its inhibitor CAL-101 (Idelalisib) has shown considerable efficacy in the treatment of relapsed and refractory CLL (14-16). In CLL patients receiving Idelalisib treatment, rapid and drastic reduction of lymphadenopathy associated with a transient increase of lymphocytosis, were interpreted as an interference with the crosstalk between malignant B cells and the lymph node microenvironment. Our previous model proposed that BCR signalling capacity allows CLL cells from progressive cases to graft within the lymph nodes by dramatically reducing their mobility through CXCR4 down-regulation (10). Thus, our results suggest that clinical efficacy of PI3K- $\delta$  inhibitors relies notably on their ability to prevent PI3K-dependent down-regulation of CXCR4 in response to BCR engagement and to restore the capacity of CLL cells to exit from the lymph nodes. Based on the functional implication of the PKDs in BCR-dependent CXCR4 internalisation and in light with the effect of PKD inhibitors in blocking pancreatic cancer growth in a xenograft mouse model (46),

therapeutic potential of CID755673, or other specific PKD inhibitors, could be explored in CLL.

One target of activated serine kinase PKDs that we evidenced is membrane CXCR4, which in line is a chemokine receptor involved in numerous biological functions and implicated in several cancers and other diseases. For the first time, we demonstrate that CXCR4 is phosphorylated on serine residues 324/325, but not on residues 338/339, upon BCR triggering. Moreover, PKD inhibition compromises the chemokine receptor phosphorylation in BCR-stimulated CLL cells. These data are in line with our *in silico* analysis revealing a PKD phosphorylation consensus site in CXCR4 (320 to 325) and are supported by a model proposing that PKC phosphorylates Ser<sup>339</sup> of CXCR4 upon CXCL12- or EGF-stimulations as well as PMA treatment (47). Thus, recognition of various kinases may be required for an appropriate CXCR4 regulation with specific interactions through alternative phosphorylation patterns and the mechanisms mediating CXCR4 endocytosis may vary among cell types (18-20, 36, 48).

In conclusion, BCR engagement initiates a PIK3- $\delta$ -dependent activation of PKD2/3 that in turn phosphorylates CXCR4 and contributes to its internalisation in CLL cells. Our data reinforce the concept that targeting BCR-mediated pathways *via* downstream intermediates is a promising therapeutic approach in CLL.

### **Acknowledgments**

This study was supported by INSERM, University Paris 13 and grant of Fondation de France. SSG and MQ were the recipients of Société Française d'Hématologie and Ligue Nationale Contre le Cancer fellowships, respectively. We acknowledge P.O. Schischmanoff for designing specific probes for Q-PCR analyses of PKD isoforms and S. Le Coquil for assistance in sample preparation.

### **Authorship Contributions**

S.S.G., M.Q., V.Lau. and L.G. performed the experiments and analysed the data. V.Lev. and F.A.C. provided patients' samples. C.L.R and D.L. designed the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript with NVB.

## References

1. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* 1991;78:1901-14.
2. Caligaris-Cappio F, Ferrarini M. B cells and their fate in health and disease. *Immunol Today* 1996;17:206-8.
3. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev* 1997;11:119-28.
4. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804-15.
5. Letestu R, Levy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* 2010;116:4588-90.
6. Hillmen P. Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:104-9.
7. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* 2006;66:7158-66.
8. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev* 2007;7:102-8.
9. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:405-18.
10. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is



- triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res* 2009;69:6387-95.
11. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, et al. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120:356-65.
  12. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005;115:755-64.
  13. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:563-74.
  14. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011;117:591-4.
  15. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;123:3390-7.
  16. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2013.
  17. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, Henneberg M, Hu J, Kurtova AV, et al. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood* 2009;113:5549-57.

18. Signoret N, Rosenkilde MM, Klasse PJ, Schwartz TW, Malim MH, Hoxie JA, et al. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 18):2819-30.
19. Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Marchese A, Benovic JL. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* 1999;274:31076-86.
20. Marchese A. Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Curr Opin Cell Biol* 2014;27:72-7.
21. Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* 2005;280:13205-8.
22. Fu Y, Rubin CS. Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep* 2011;12:785-96.
23. Matthews SA, Navarro MN, Sinclair LV, Emslie E, Feijoo-Carnero C, Cantrell DA. Unique functions for protein kinase D1 and protein kinase D2 in mammalian cells. *Biochem J* 2010;432:153-63.
24. Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 1997;272:952-60.
25. Jacamo R, Sinnott-Smith J, Rey O, Waldron RT, Rozengurt E. Sequential protein kinase C (PKC)-dependent and PKC-independent protein kinase D catalytic activation via Gq-coupled receptors: differential regulation of activation loop Ser(744) and Ser(748) phosphorylation. *J Biol Chem* 2008;283:12877-87.
26. Guo J, Gertsberg Z, Ozgen N, Sabri A, Steinberg SF. Protein kinase D isoforms are activated in an agonist-specific manner in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2011;286:6500-9.

27. Steinberg SF. Regulation of protein kinase D1 activity. *Mol Pharmacol* 2012;81:284-91.
28. Kovalevska LM, Yurchenko OV, Shlapatska LM, Berdova GG, Mikhalap SV, Van Lint J, et al. Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas. *Exp Oncol* 2006;28:225-30.
29. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, et al. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 1993;268:9194-7.
30. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266:15771-81.
31. Faubert Kaplan BL, Kaminski NE. Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/Io-stimulated mouse splenocytes. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1503-10.
32. Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* 1996;392:77-80.
33. Sharlow ER, Giridhar KV, LaValle CR, Chen J, Leimgruber S, Barrett R, et al. Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinone. *J Biol Chem* 2008;283:33516-26.
34. Azoitei N, Pusapati GV, Kleger A, Moller P, Kufer R, Genze F, et al. Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut* 2010;59:1316-30.
35. Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *J Biol Chem* 1999;274:26543-9.

36. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, et al. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem* 1997;272:28726-31.
37. Vigorito E, Kovesdi D, Turner M. Synergistic activation of PKD by the B cell antigen receptor and CD19 requires PI3K, Vav1 and PLCgamma. *Cell Signal* 2006;18:1455-60.
38. Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, et al. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J* 2007;404:15-21.
39. Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes. *J Exp Med* 2000;191:2075-82.
40. Pracht C, Minguet S, Leitges M, Reth M, Huber M. Association of protein kinase C-delta with the B cell antigen receptor complex. *Cell Signal* 2007;19:715-22.
41. Matthews SA, Dayalu R, Thompson LJ, Scharenberg AM. Regulation of protein kinase C $\delta$  by the B-cell antigen receptor. *J Biol Chem* 2003;278:9086-91.
42. Sinnott-Smith J, Jacamo R, Kui R, Wang YM, Young SH, Rey O, et al. Protein kinase D mediates mitogenic signaling by Gq-coupled receptors through protein kinase C-independent regulation of activation loop Ser744 and Ser748 phosphorylation. *J Biol Chem* 2009;284:13434-45.
43. Xu KP, Dartt DA, Yu FS. EGF-induced ERK phosphorylation independent of PKC isozymes in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3673-9.

44. Lin WW, Chang SH, Wang SM. Roles of atypical protein kinase C in lysophosphatidic acid-induced type II adenylyl cyclase activation in RAW 264.7 macrophages. *Br J Pharmacol* 1999;128:1189-98.
45. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 2010;116:2078-88.
46. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung B, et al. A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1136-46.
47. Woerner BM, Warrington NM, Kung AL, Perry A, Rubin JB. Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res* 2005;65:11392-9.
48. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, Marsh M, Kurosaki T, Ravetch JV. B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med* 1999;189:1461-6.

## Figure legends:

Figure 1. **Specific effects of PKC and PKD inhibitors on BCR-mediated membrane CXCR4 down-regulation.** CLL cells were incubated for 24 hours in the presence (anti-IgM) or not (Unstimulated) of immobilized anti-IgM antibodies and in the presence or not (Untreated) of 1  $\mu$ M Gö6983 (*A*), 1  $\mu$ M Gö6976 (*A* and *B*), 1  $\mu$ M GF109203X (*B*) or 50  $\mu$ M CID755673 (*C*). After membrane labelling, CXCR4 and CD19 expressions were determined by flow cytometry and percentage of CXCR4 decrease was evaluated.

Figure 2. **PKDs mediate BCR-dependent CXCR4 down-regulation in CLL cells.** CLL cells from various patients (UPN) were stimulated for 24 hours with immobilized anti-IgM antibodies in the presence or not (Untreated) of 1  $\mu$ M Gö6983 (*A*), 1  $\mu$ M Gö6976 (*A* and *B*), 1  $\mu$ M GF109203X (*B*) or 50  $\mu$ M CID755673 (*C*). Percentages of CXCR4 decrease were calculated and graphed for the various conditions. *P* values are indicated; *ns*, not significant.

Figure 3. **PKD2 and PKD3 are expressed in CLL cells.** (*A*) PKD1, 2 and 3 mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR in CLL cells (n=15) and normal B cells, normalized to cyclophilin and graphed. (*B*) Protein extracts from 293T and CLL cell samples were separated on SDS-PAGE and analysed by immuno-blotting with the indicated antibodies;  $\alpha$ -tubulin expression was used as a loading control.

Figure 4. **BCR engagement leads to specific PKD phosphorylation correlated with CXCR4 down-regulation in CLL responsive cells.** (*A*) CLL cells samples were stimulated (+) or not (-) with anti-IgM for 30 minutes. Phosphor-Ser<sup>744/748</sup> and total PKD (PKD1/2) contents were analysed by western blotting using the indicated antibodies. Fold increase of

phosphoSer<sup>744/748</sup> PKD (normalized to total PKD) were calculated for each UPN and (B) graphed relative to BCR-dependent CXCR4 decrease (Supplementary Table S2). (C) CLL cells were stimulated (+) or not (-) with immobilized anti-IgM antibodies for 30 minutes or with PMA (200 nM) for 15 minutes. After protein extraction, phosphorylated (Ser<sup>744/748</sup> and Ser<sup>916</sup>) and total PKD (PKD1/2) expressions were analysed by western blotting using the indicated antibodies. (D) CLL cells from a representative patient (UPN 1) were stimulated (anti-IgM) or not (Control) for 30 minutes in the presence (+) or not (-) of CID755673 (50  $\mu$ M). Phosphorylated (Ser<sup>744/748</sup> and Ser<sup>916</sup>) and total PKD (PKD1/2) were analysed by western blotting.

**Figure 5. BCR-unresponsive cells are still able to respond to PMA treatment.** (A) CLL cells were stimulated (anti-IgM) or not (Unstimulated) for 24 hours and in the presence or not (Untreated) of CID755673 (50  $\mu$ M). CXCR4 and CD19 expressions were determined by flow cytometry. (B) CLL cells were incubated (+) or not (-) with anti-IgM for 30 minutes. Phosphorylated Ser<sup>744/748</sup> and total PKD (PKD1/2) were analysed by western blotting. Indicated fold increase of phosphoSer<sup>744/748</sup> PKD (normalized to total PKD) were calculated for each UPN. (C) CLL cells were stimulated with anti-IgM, or PMA (200 nM) for 24 hours or left unstimulated. CXCR4 and CD19 expressions were determined by flow cytometry. (D) CLL cells were incubated in the presence (+) or not (-) of PMA (200 nM) for 15 minutes. Phosphorylated (Ser<sup>744/748</sup> and Ser<sup>916</sup>) and total PKD (PKD1/2) were analysed by western blotting.

**Figure 6. PKD is required for BCR-dependent CXCR4 phosphorylation in CLL cells.** (A) CLL cells from one representative case (UPN 97) were stimulated or not, immuno-labelled with anti-CXCR4 (red) and -pSer<sup>324/325</sup> CXCR4 (green) antibodies and nuclei were

counterstained with Dapi (blue). Scale bars represent a 10  $\mu\text{m}$  length. (B) CLL cells from one representative patient (UPN 96) were stimulated (+) or not (-) with immobilized anti-IgM antibodies for 30 minutes. Phosphorylated (Ser<sup>324/325</sup> and Ser<sup>338/339</sup>) and total CXCR4, as well as phosphorylated-Ser<sup>744/748</sup> and total PKD (PKD1/2) expression levels were analysed by western blotting using the indicated antibodies; anti-HSP90 antibody showed equal amount of protein in both conditions. (C) showed representative BCR-responsive CLL cells (UPN 88) that were BCR-stimulated (+) or not (-) in the presence of CID755673 or not (control). Indicated fold increases of phosphoSer<sup>324/325</sup> CXCR4 (normalized to total CXCR4) are indicated below. Of note, the two panels (control and CID) are issued from the same western blot.

**Figure 7. PI3K- $\delta$  is acting upstream of PKDs in anti-IgM-dependent CXCR4 down-regulation.** (A) CLL cells were BCR-stimulated (+) or not (-) for 30 minutes in the presence or not of either Ly294002 (20  $\mu\text{M}$ ) or CAL101 (50  $\mu\text{M}$ ). Signals from phosphoSer<sup>744/748</sup> and total PKD were obtained with the indicated antibodies by western analysis. (B) CLL cells from one representative patient (UPN 88) were stimulated (anti-IgM) or not (Unstimulated) and treated or not with Ly294002 (20  $\mu\text{M}$ ) or CAL101 (50  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours. Flow cytometry analyses were processed on CD19<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> cells and the percentage of CXCR4 down-regulation was calculated. (C) Percentages of BCR-induced CXCR4 decrease were calculated and graphed for various CLL samples treated with Ly294002 (20  $\mu\text{M}$ , left panel) or CAL101 (50  $\mu\text{M}$ , right panel).



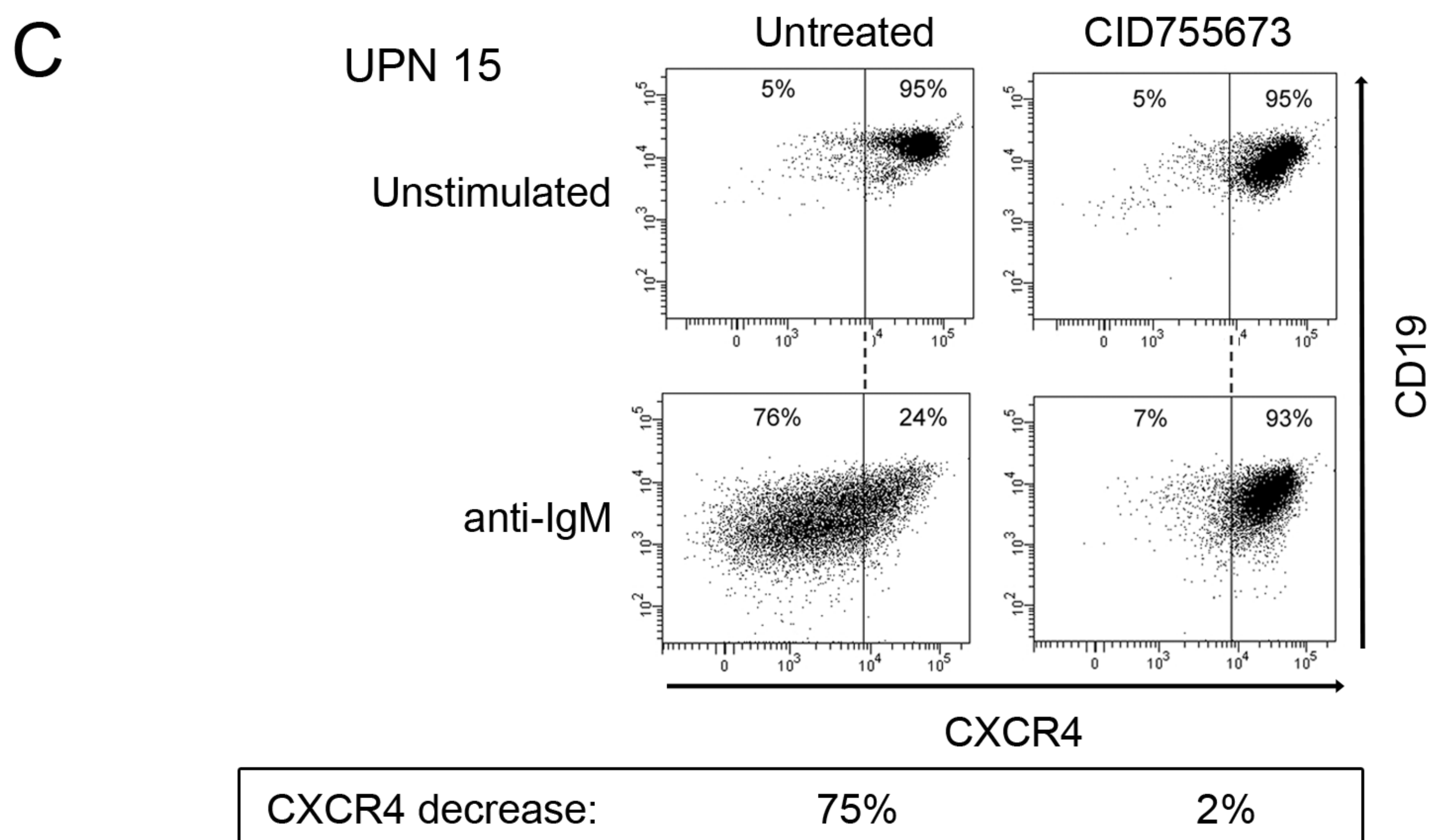
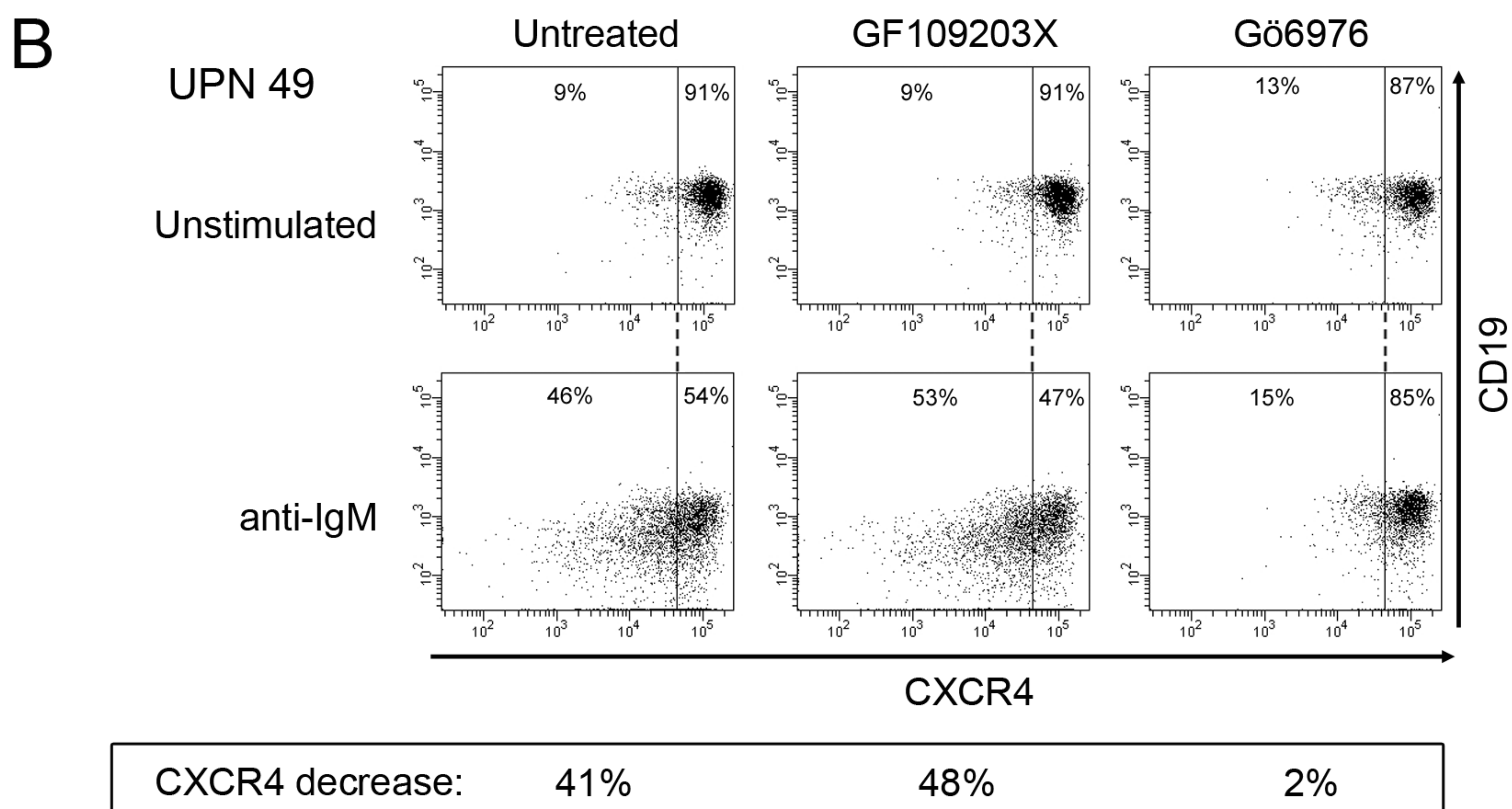
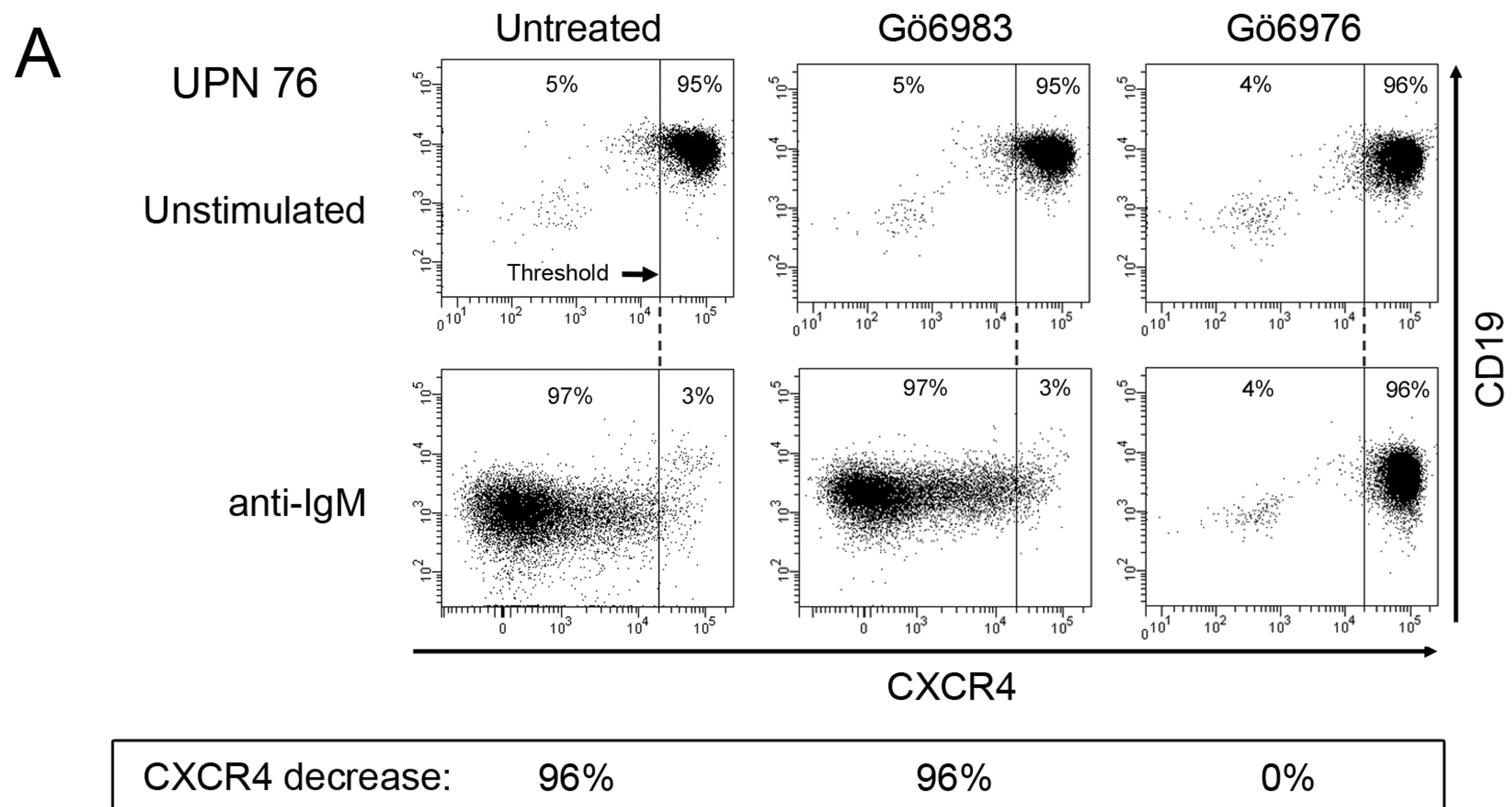


Figure 1

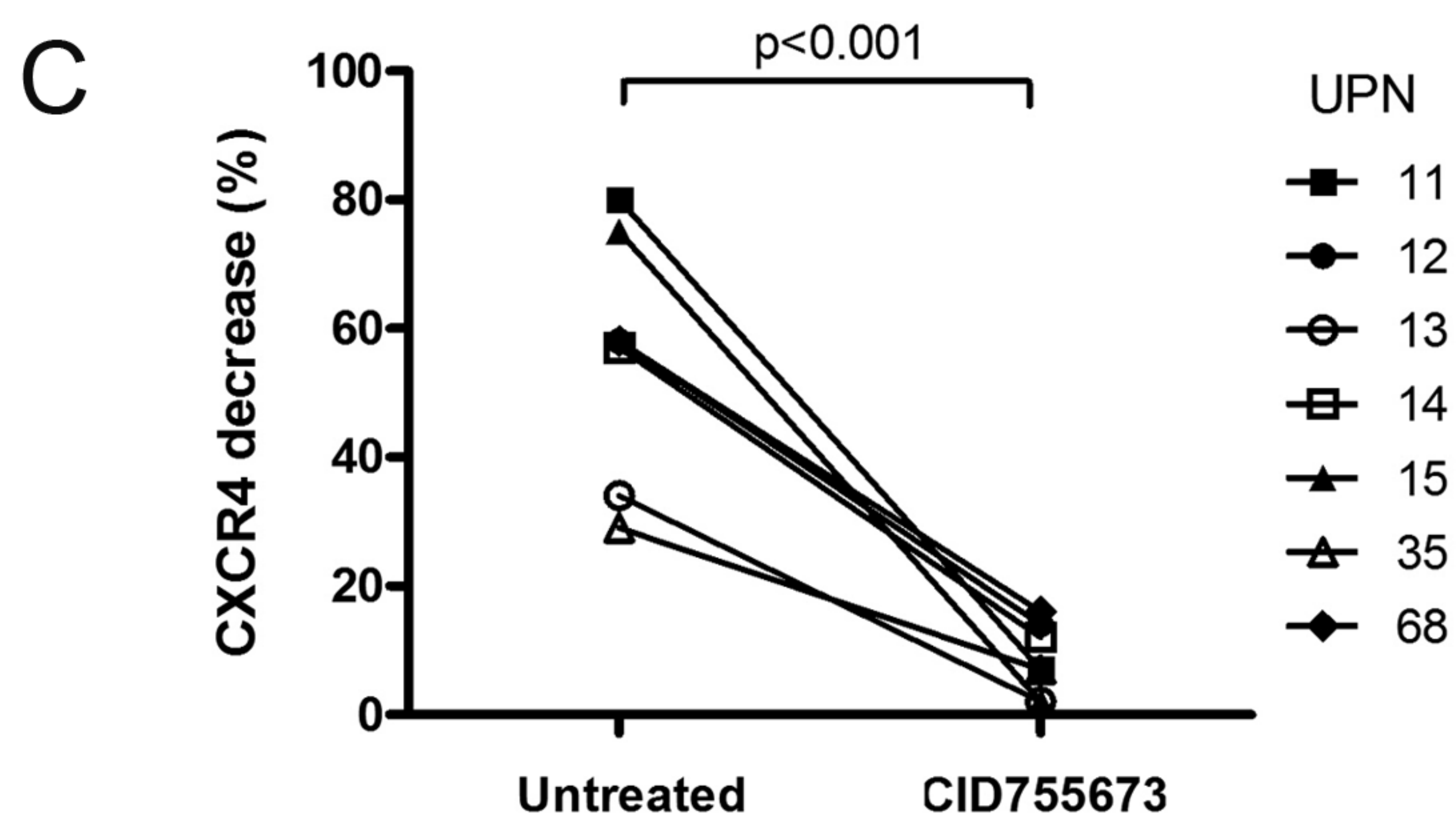
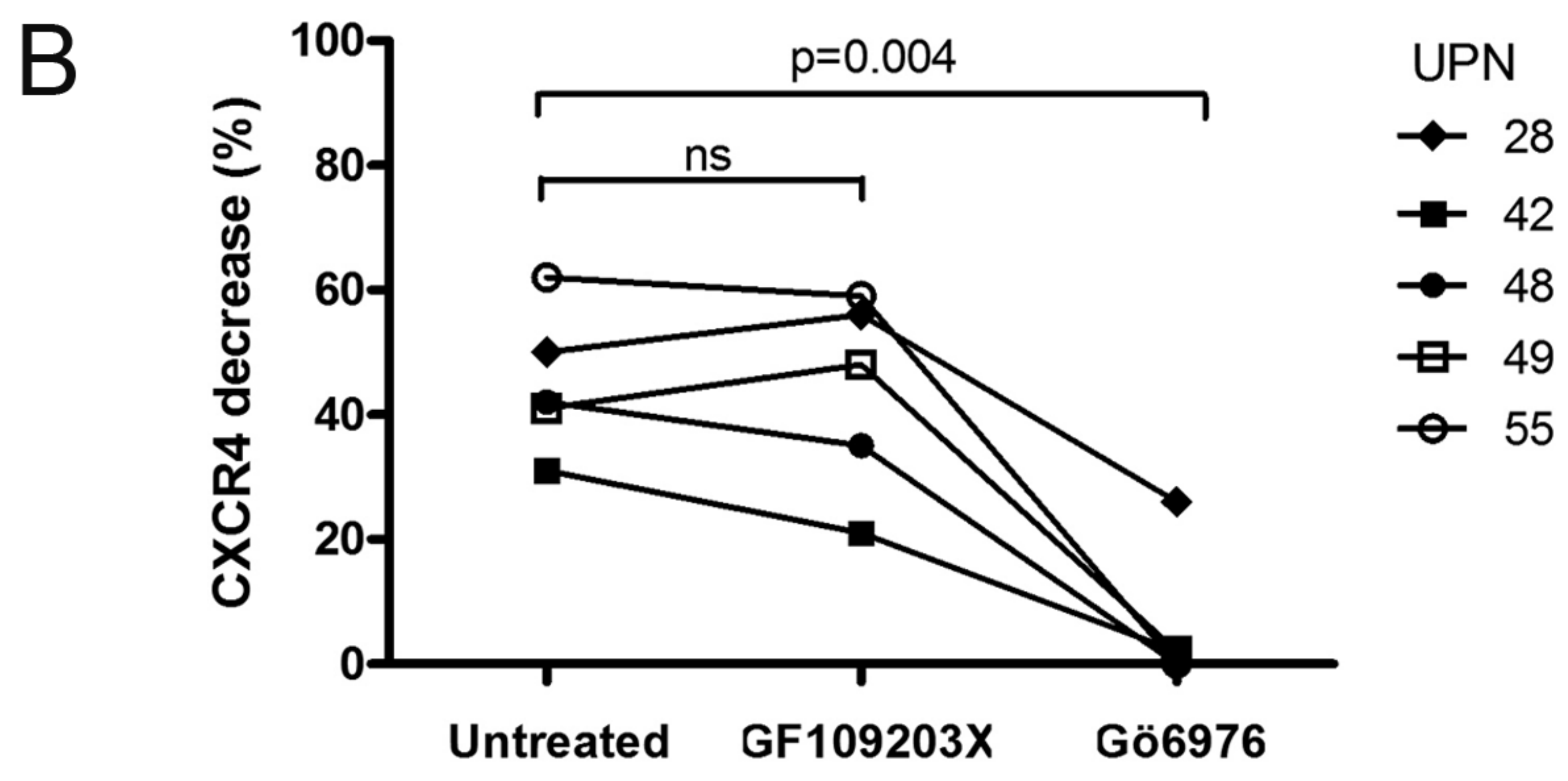
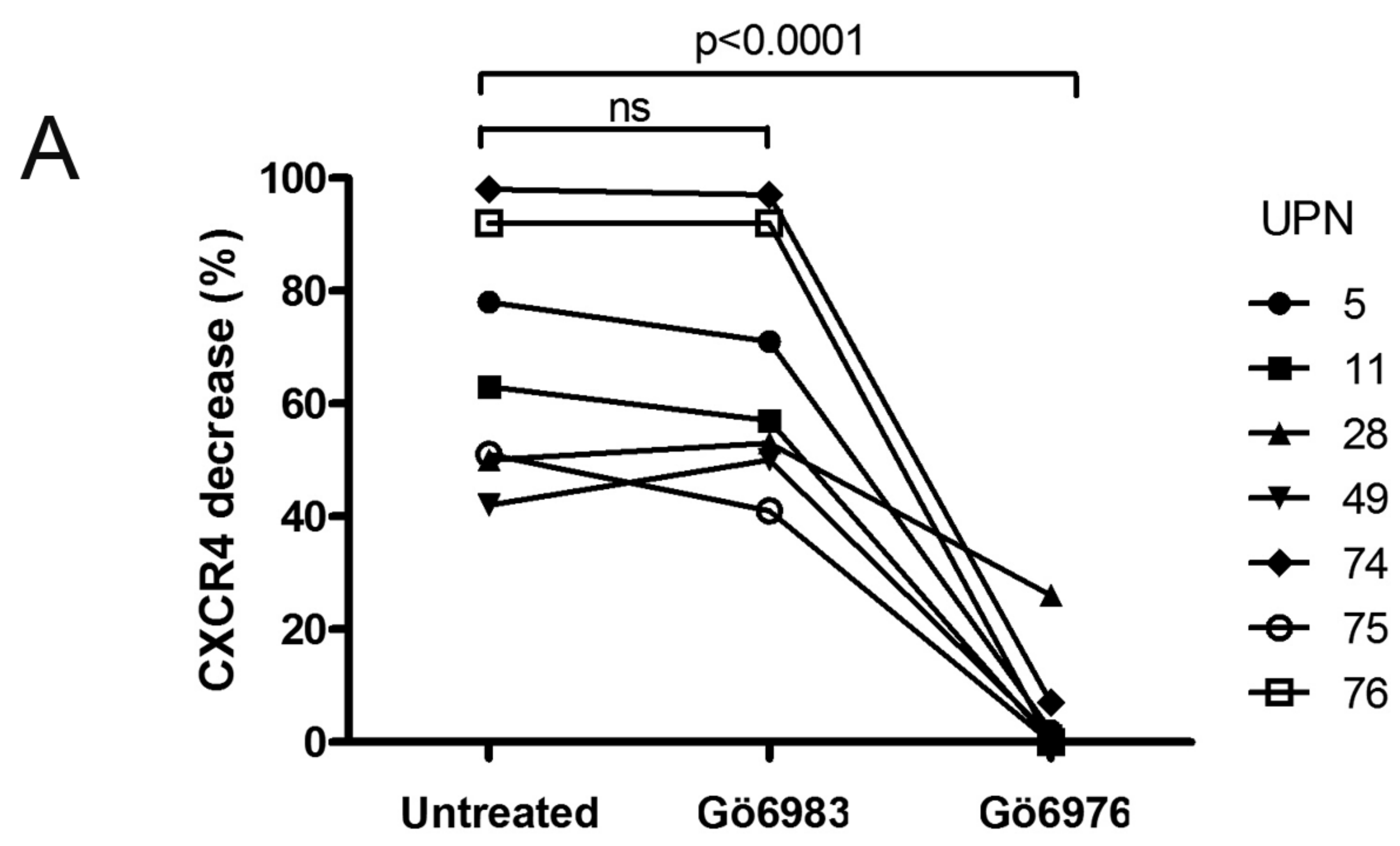
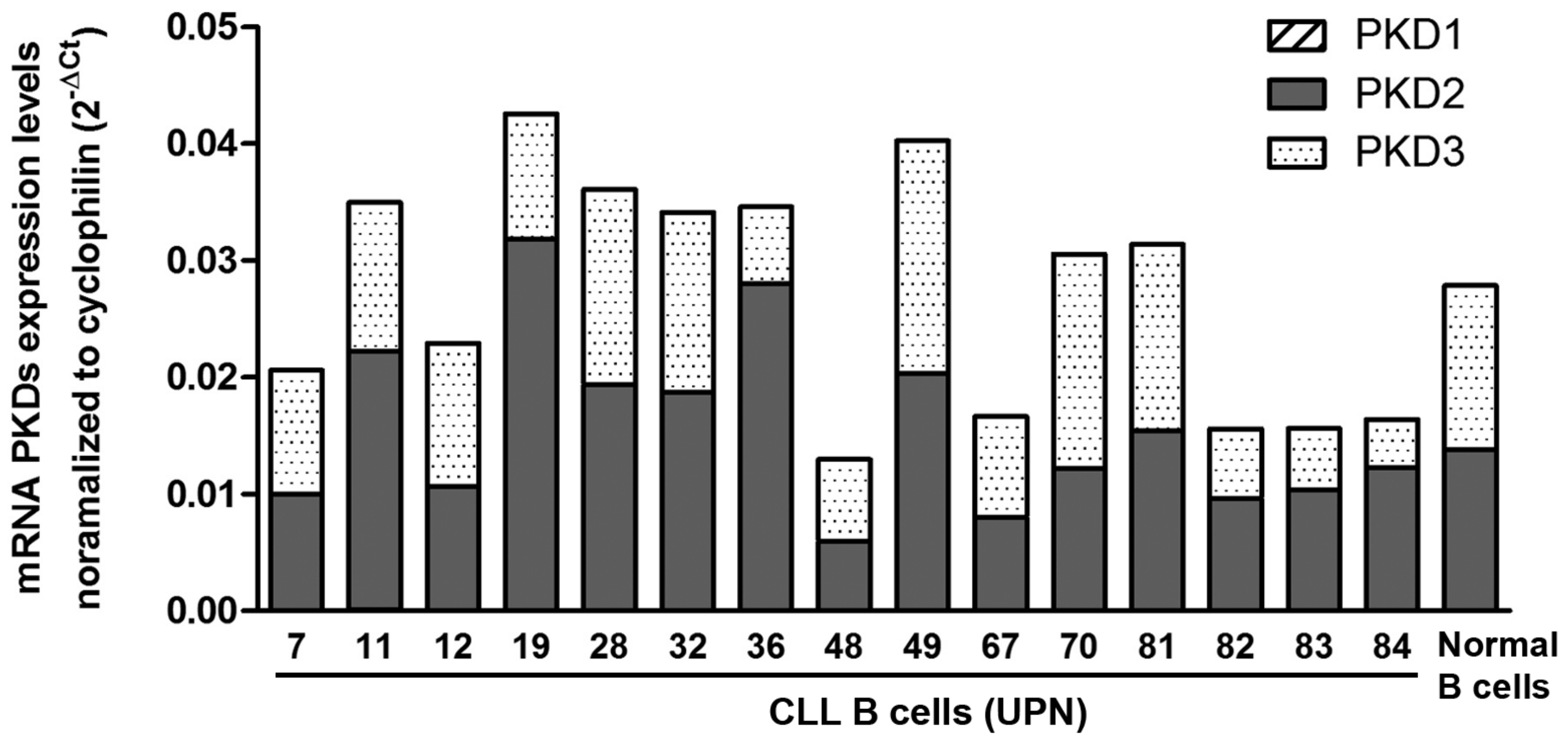


Figure 2

A



B

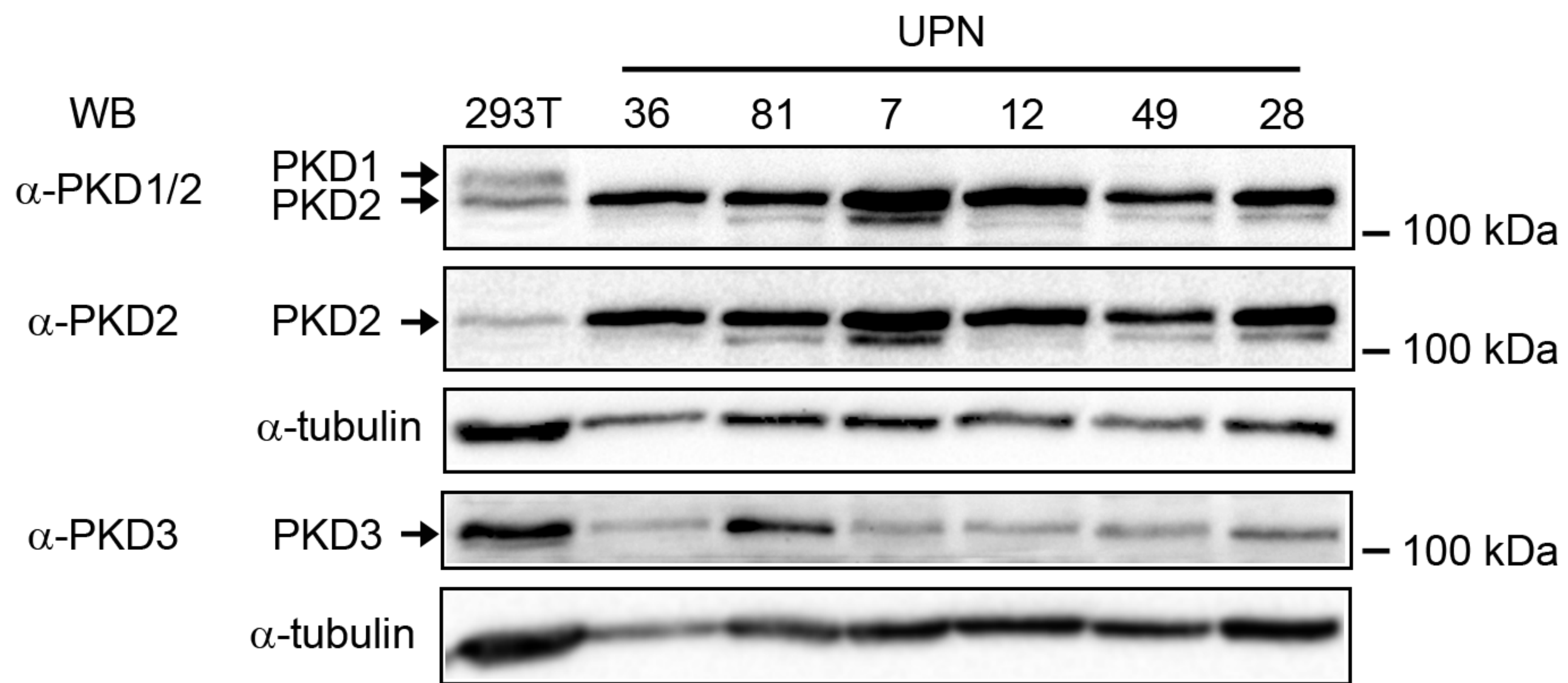
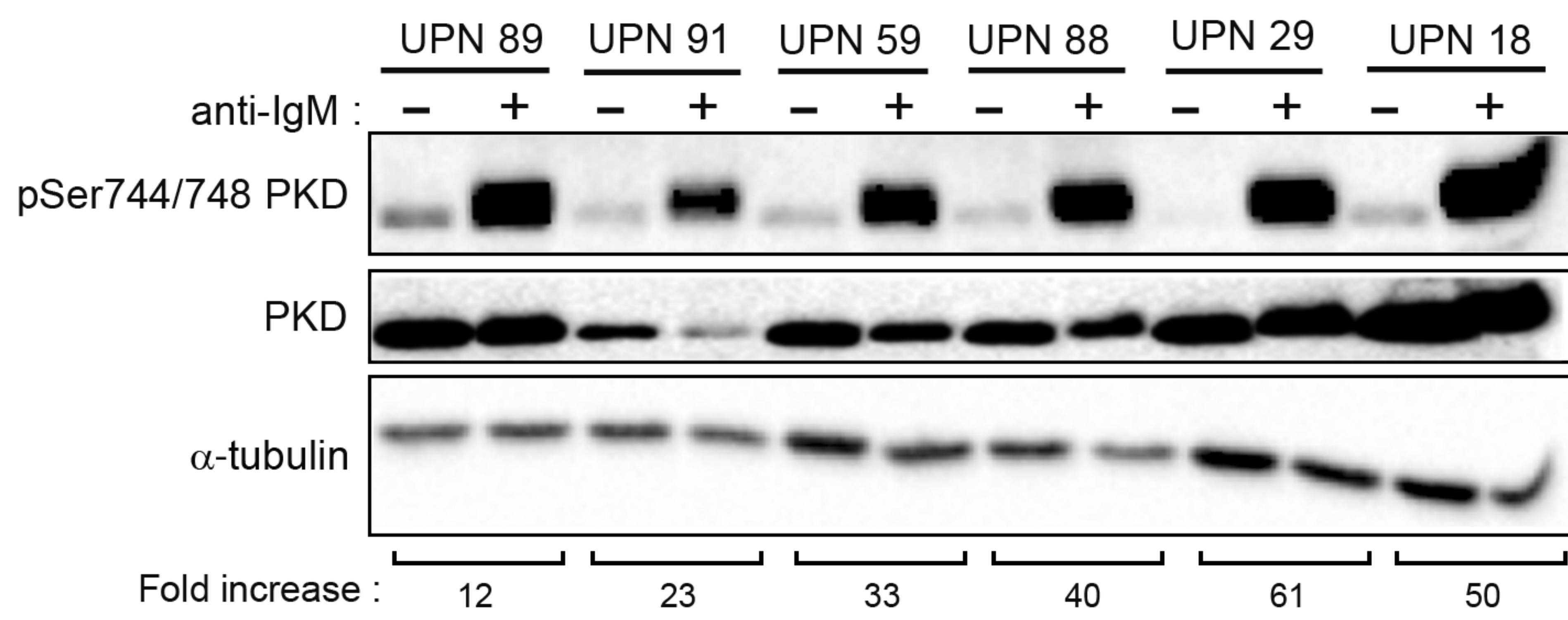
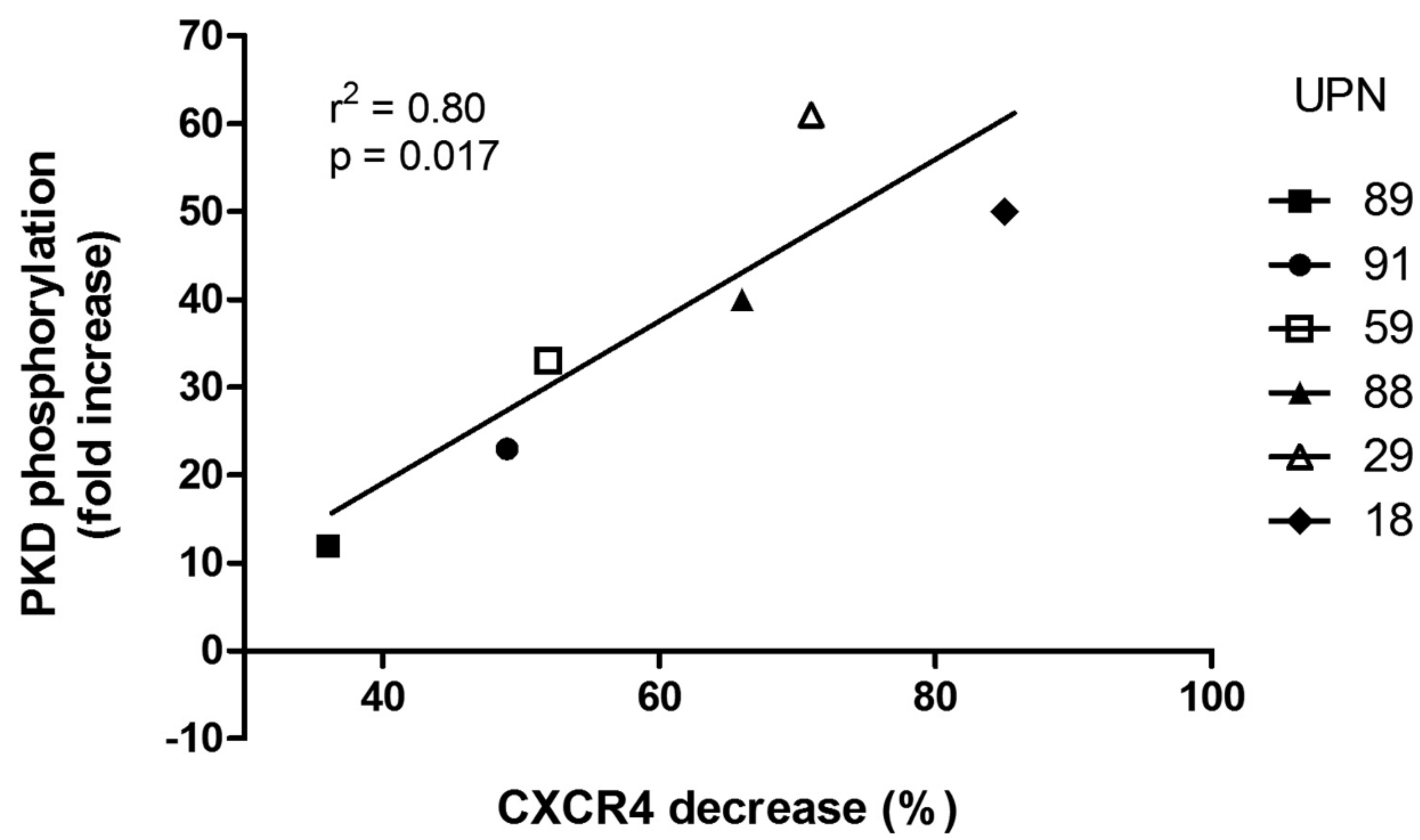


Figure 3

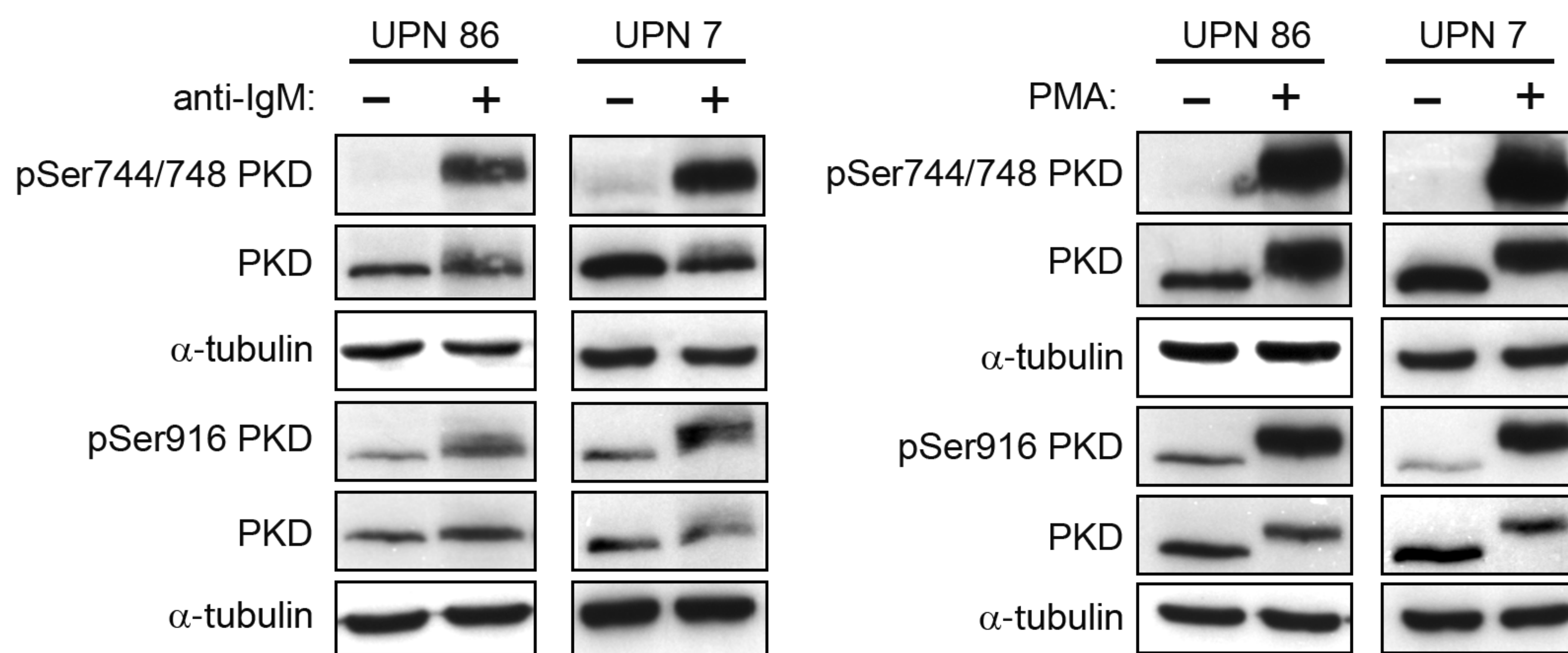
**A**



**B**



**C**



**D**

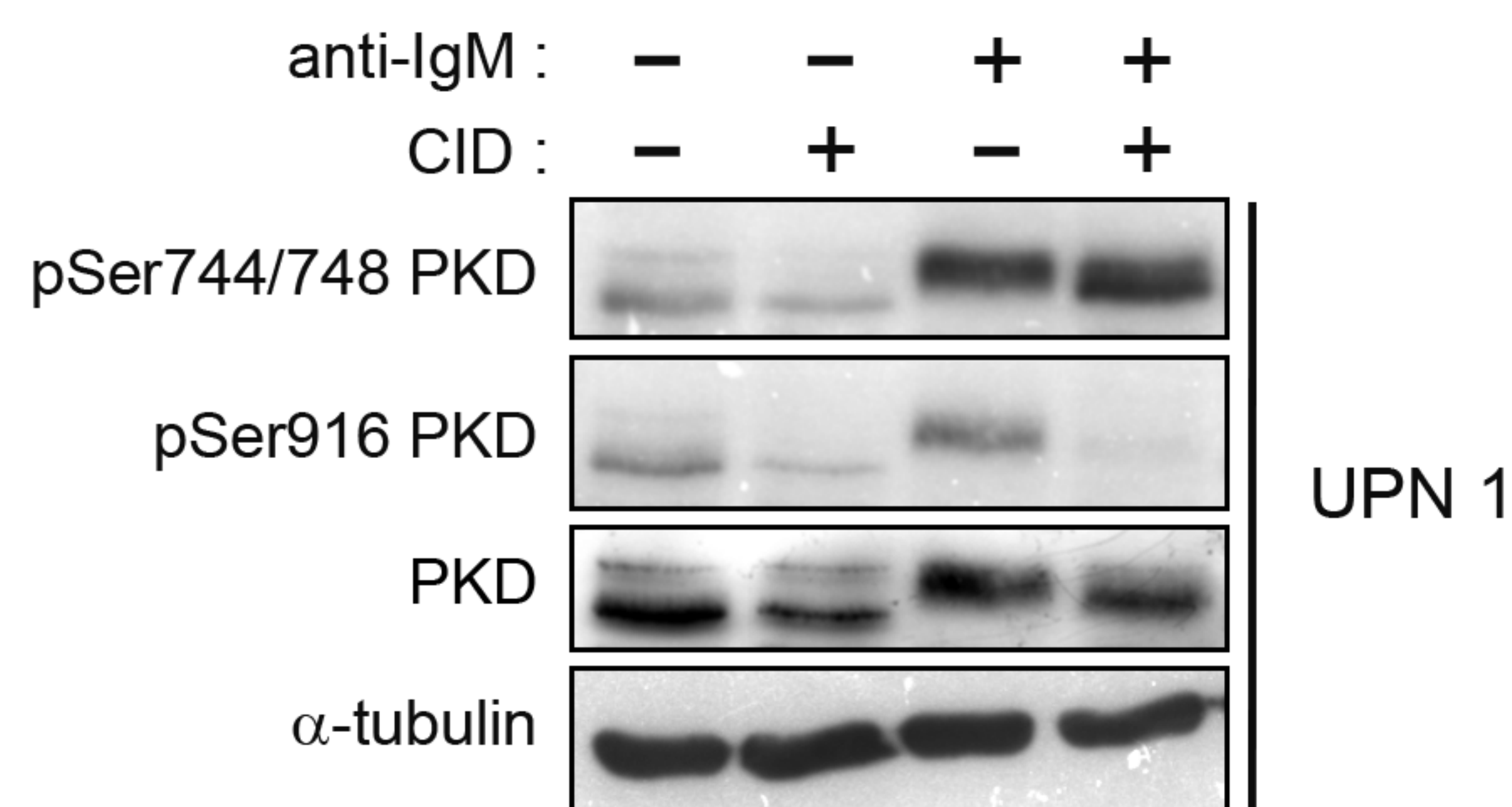


Figure 4

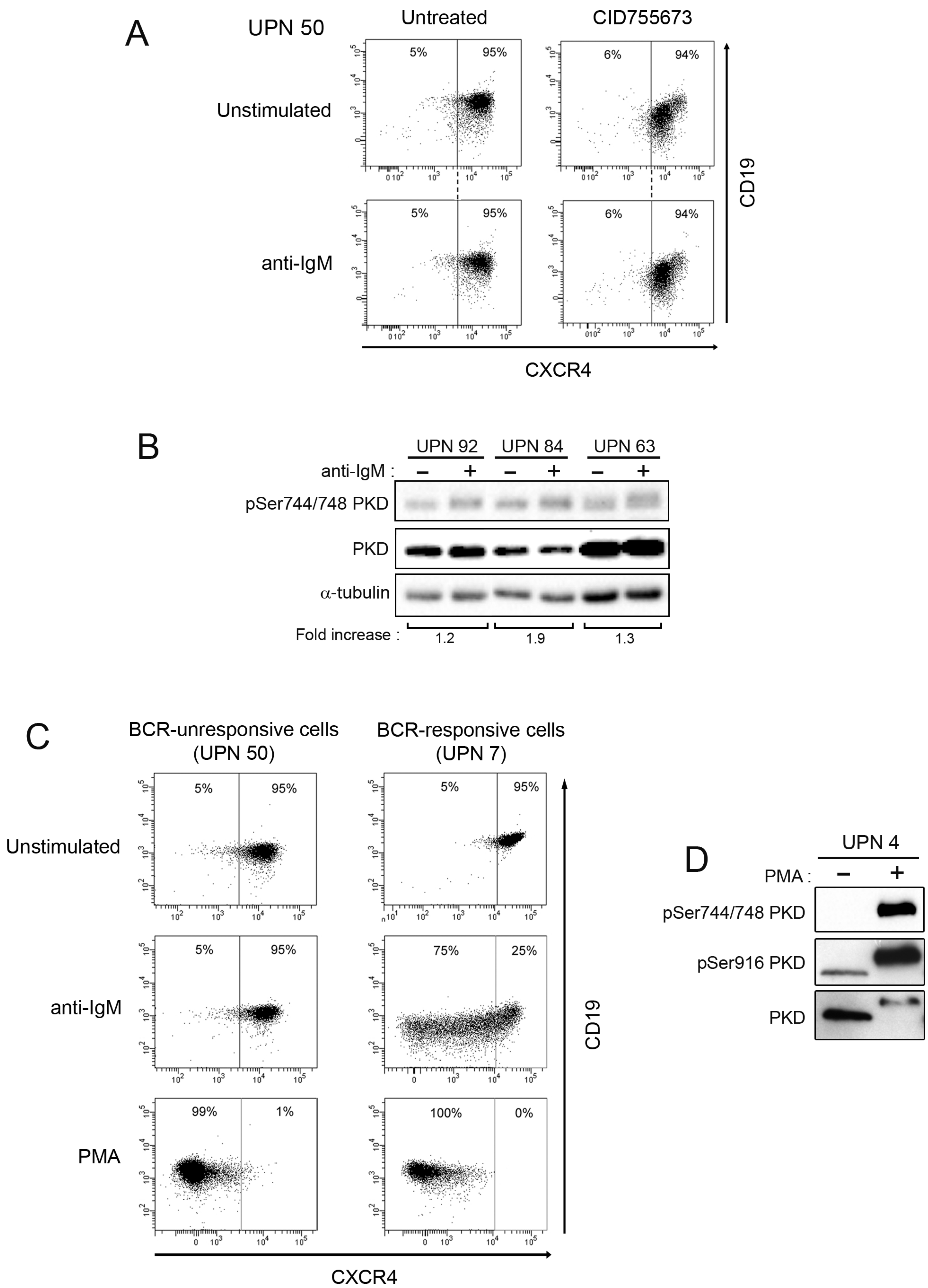


Figure 5

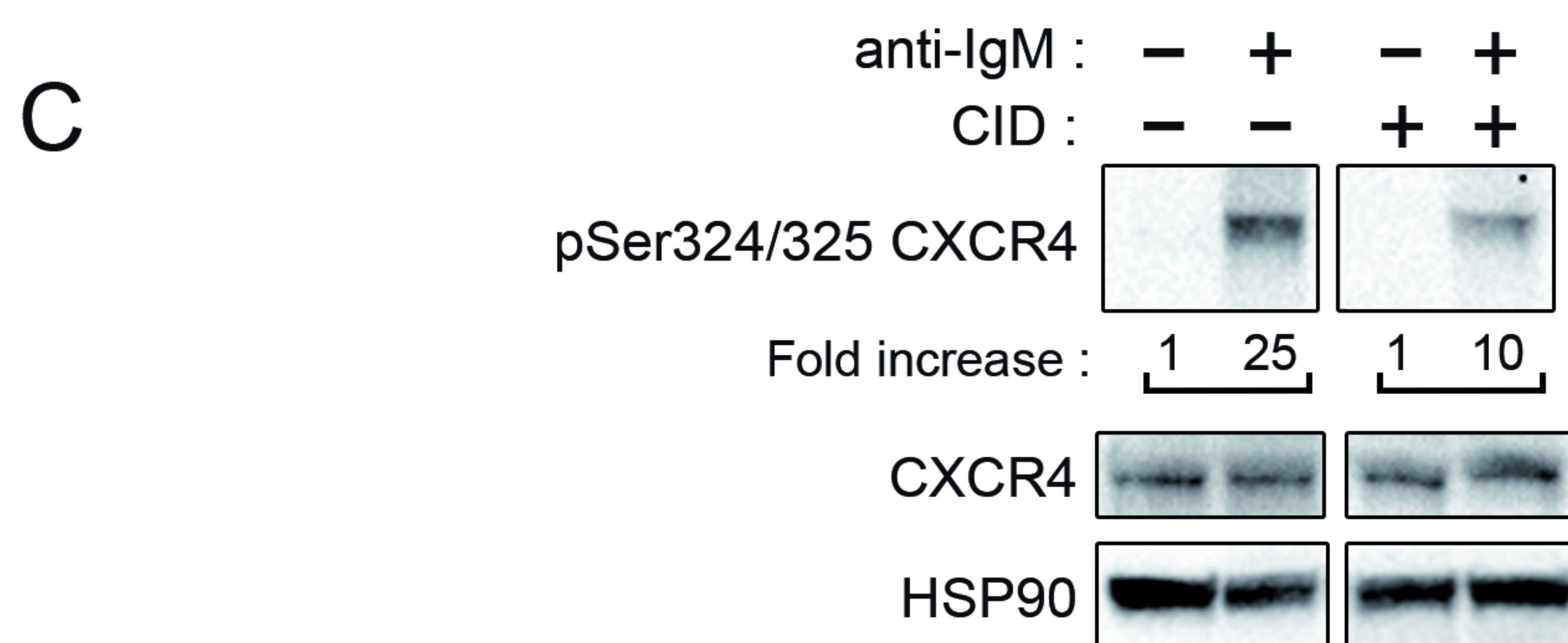
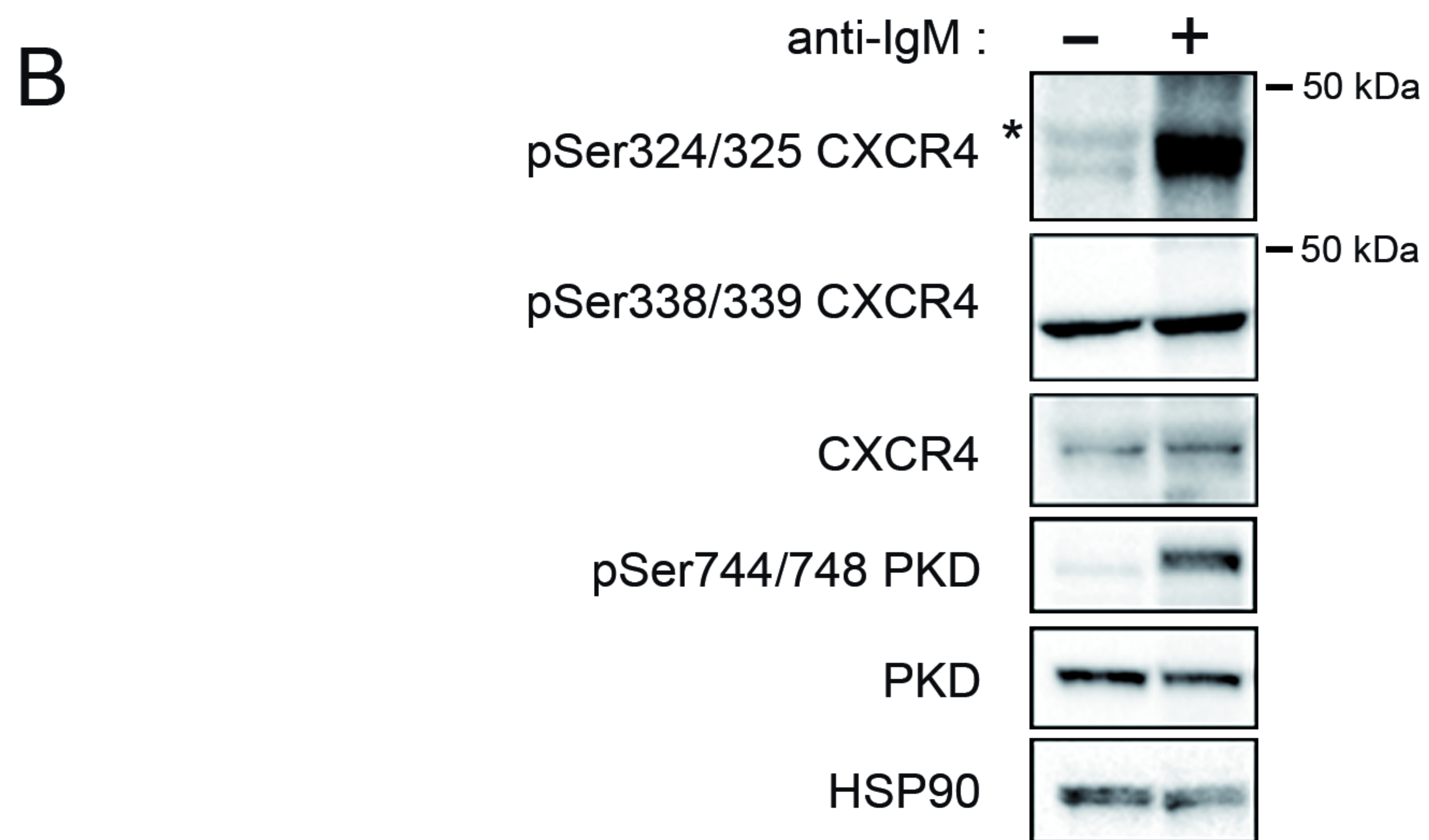
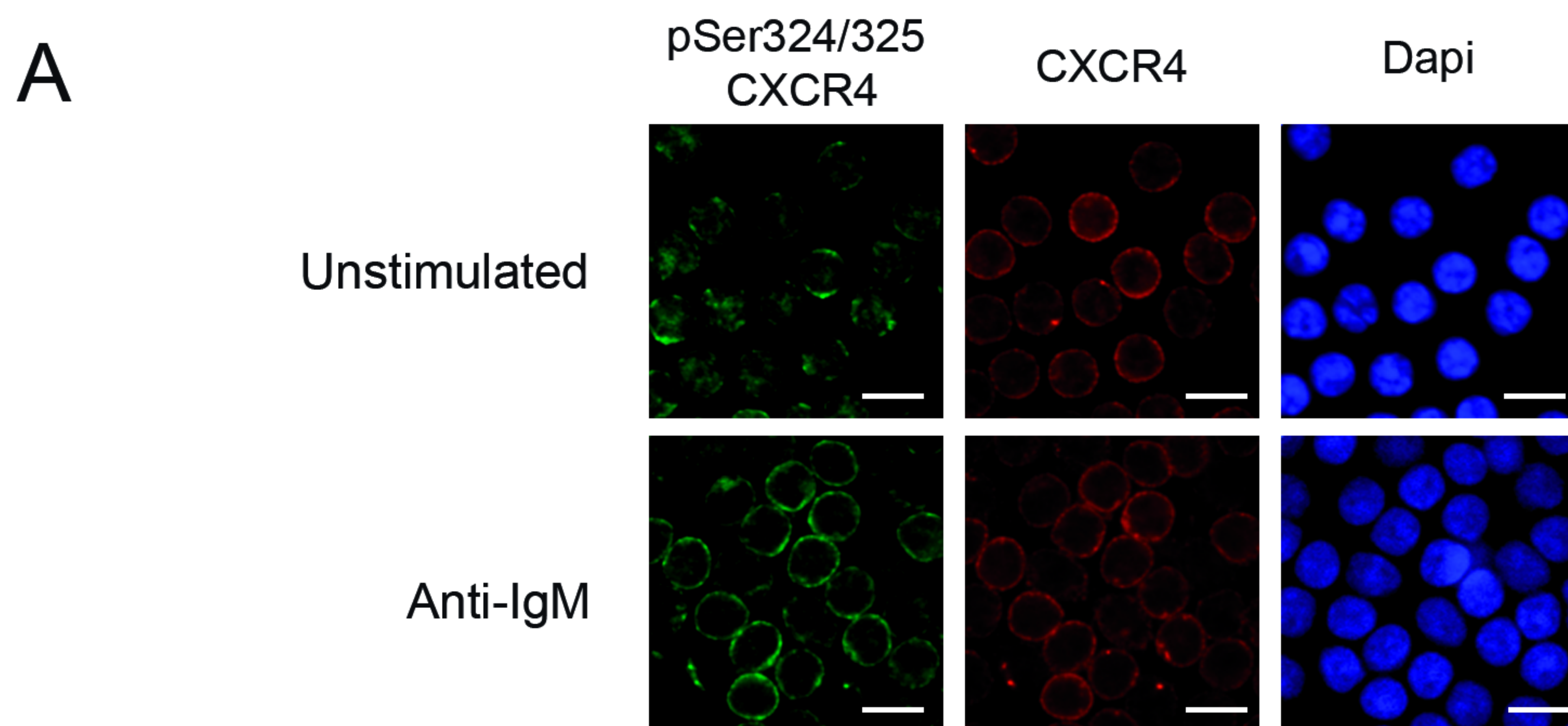


Figure 6

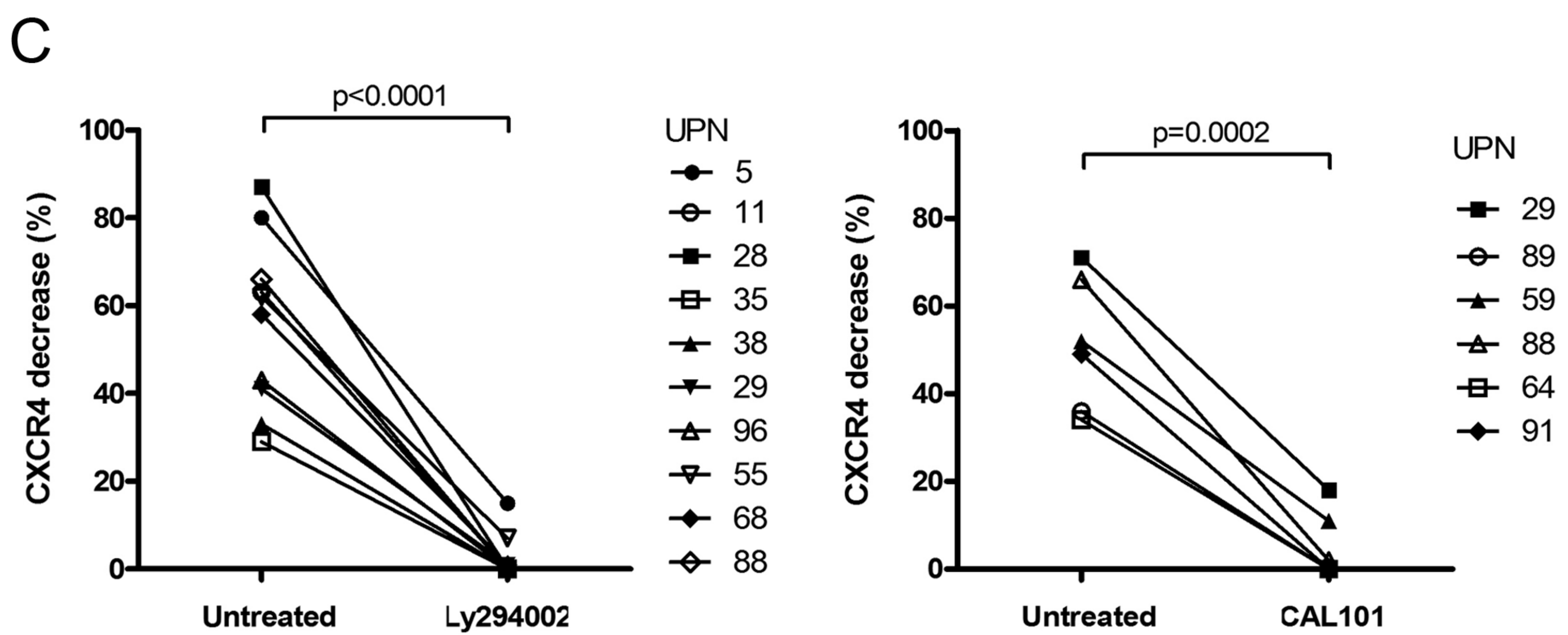
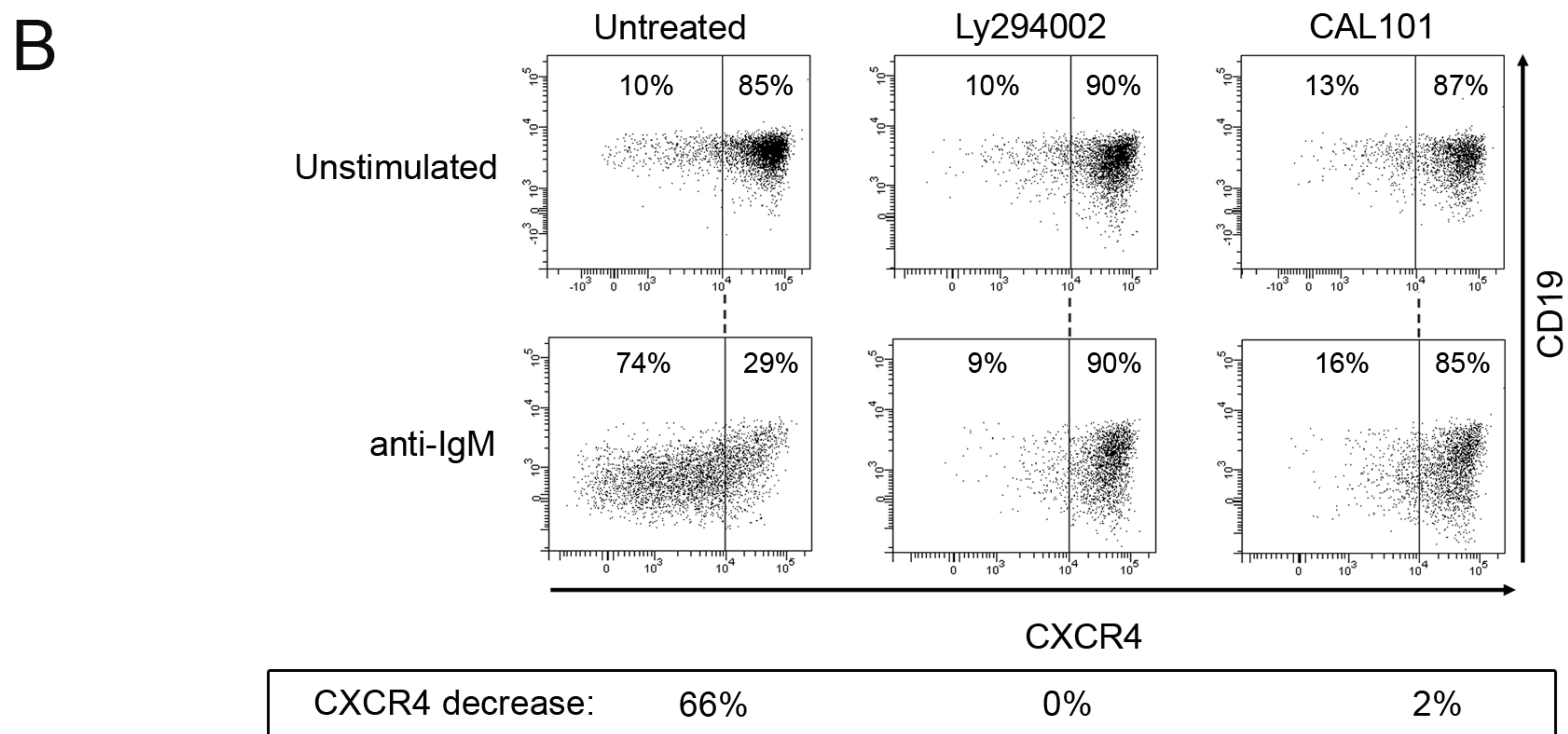
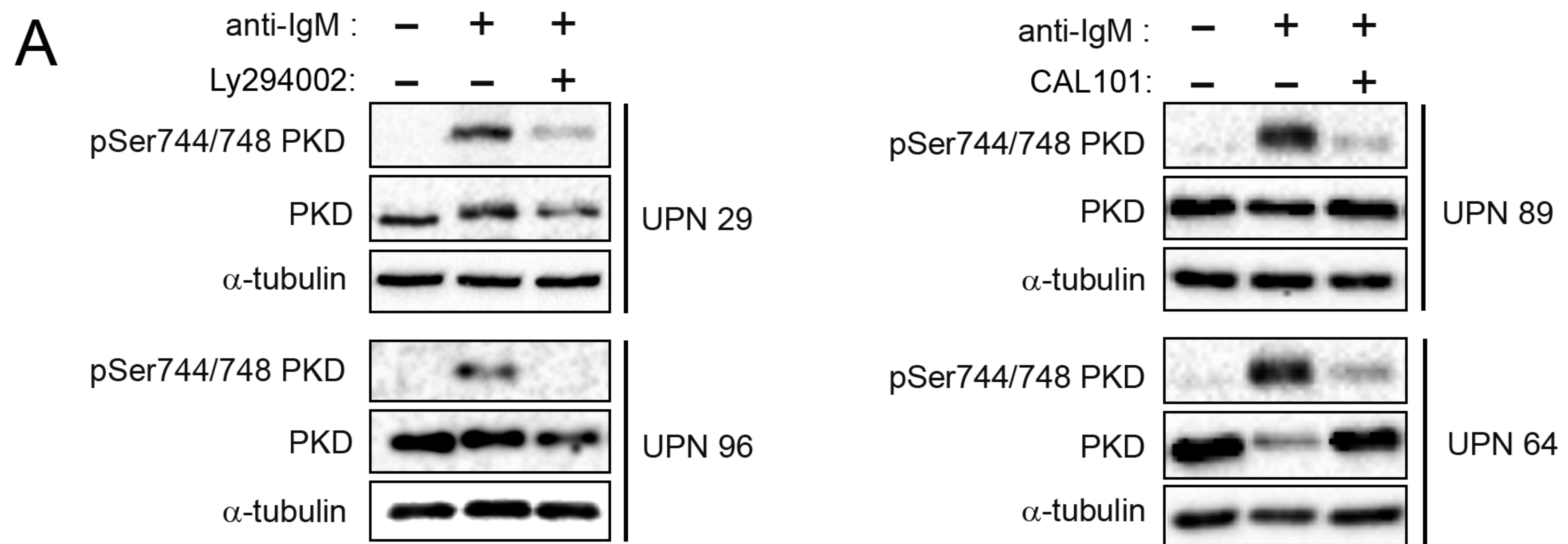
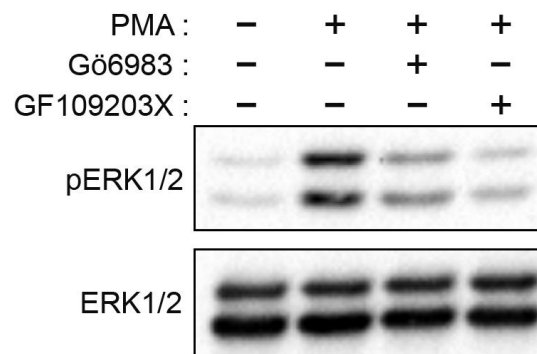
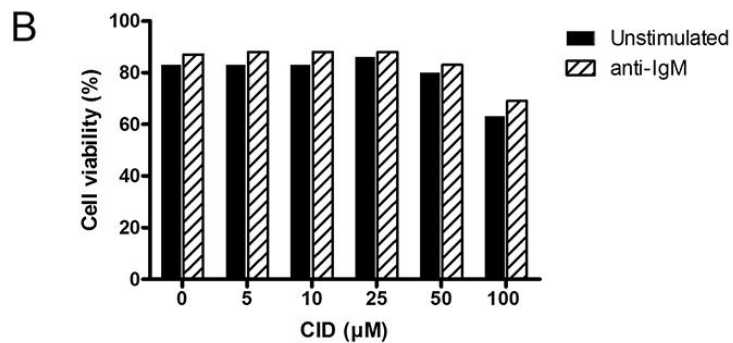
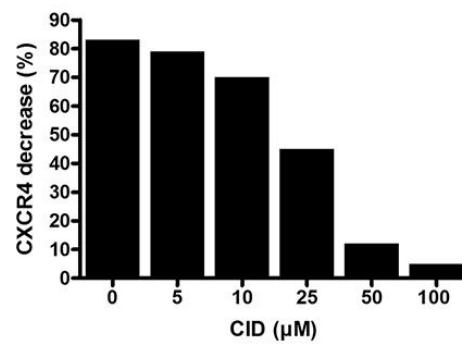
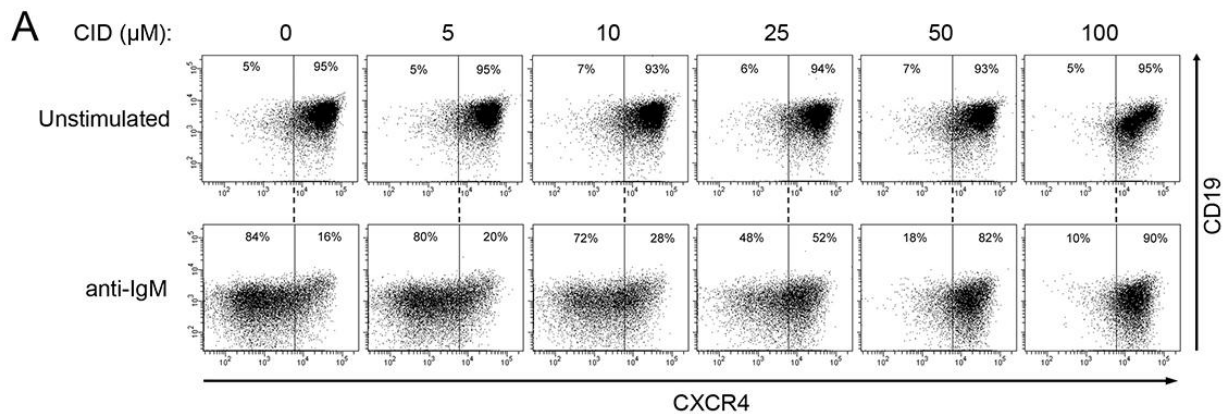


Figure 7

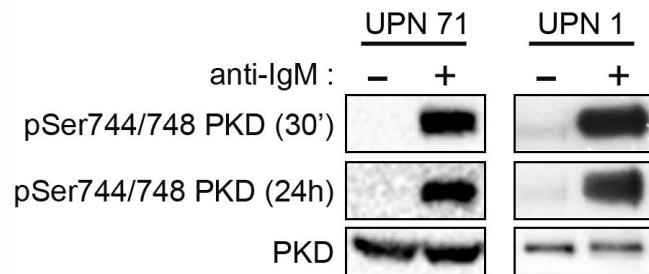


Supplementary Figure S1: **PMA-dependent ERK1/2 phosphorylation in the presence of Gö6983 and GF109203X inhibitors.** CLL cells were stimulated for 15 min (+) or not (-) with PMA and/or treated (+) or not (-) with Gö6983 or GF109203X. Phospho-ERK1/2 and ERK1/2 levels were determined by western blot using the indicated antibodies.

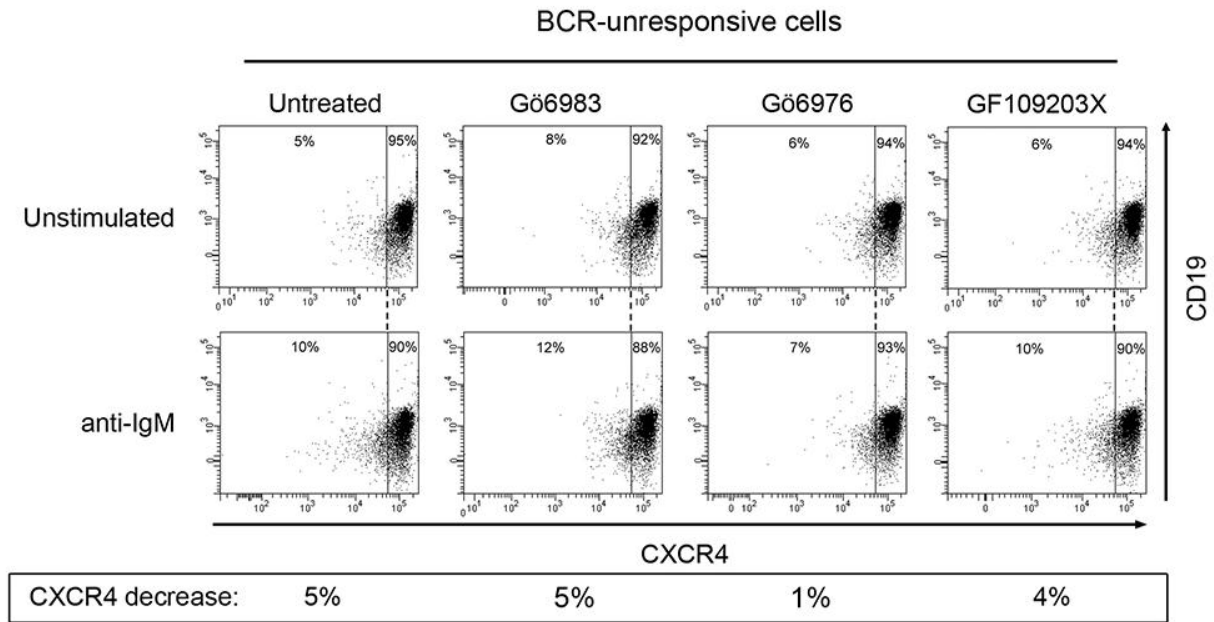




Supplementary Figure S2: **Optimisation of CID755673 dose response in CLL B cells.** CLL B cells (UPN 11) were treated with the indicated CID755673 concentrations and stimulated (anti-IgM) or not (Unstimulated) for 24 h. (A) Flow cytometry analysis of cell surface CXCR4 and CD19 expressions. Percentages of CXCR4 decrease are graphed below. (B) Viability was assessed after PO-PRO-1 Iodide labelling by flow cytometry and graphed. Optimal concentration of 50  $\mu\text{M}$  CID755673 was chosen for the study.



Supplementary Figure S3: **Phosphorylation of PKD Ser<sup>744/748</sup> upon BCR stimulation.** BCR-responsive CLL B cells were stimulated for 30 minutes or 24 hours with anti-IgM antibodies. Protein extracts were analyzed by western blotting with anti-pSer<sup>744/748</sup> PKD or anti-PKD antibodies.



Supplementary Figure S4: **Membrane CXCR4 expression under PKC/PKD inhibitory treatments of BCR-unresponsive cells.** Representative dot plots of cell surface CXCR4 and CD19 expressions in a BCR-unresponsive cell sample (UPN 47) stimulated (anti-IgM) or not (unstimulated) and treated (Gö6983 (1  $\mu$ M), Gö6976 (1  $\mu$ M) and GF109203X (1  $\mu$ M)) or not (untreated) with the indicated PKC/PKD inhibitors. The percentages of CXCR4 decrease evaluated as described in Material and Methods are indicated below.

Target	Sense primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	FAM-MGB probe (5'-3')	Amplicon size
PKD1	ctgcctgggtgcctcagtatat	aagagcactaggtcttgacagcta	aaactcaagacaatgcac	76 bp
PKD2	ctccacagcggttcttcaca	catccagttgggcaggaa	ccagcaatgaactgttc	74 bp
PKD3	gctgagttgtatgtcttgcatagc	atgggtcagtcagaacatgcat	ccactctgctgctaaa	66 bp

Supplementary Table S1: **PKD primers used for real-time PCR in CLL and normal B cells.**

UPN	CXCR4 decrease (%)
<b>BCR-responsive cells</b>	
74	98
76	96
1	86
18	85
97	83
5	78
15	75
7	74
29	71
67	70
32	66
88	66
11	63
55	62
12	58
68	58
14	57
19	52
59	52
75	51
28	50
91	49
36	45
96	43
48	42
86	42
49	41
89	36
13	34
64	34
38	33
42	31
35	29
71	20
81	16
82	10
<b>BCR-unresponsive cells</b>	
47	5
63	5
83	5
84	5
93	5
4	0
50	0
70	0
92	0

Supplementary Table S2: **Percentage of CXCR4 decrease in response to sustained BCR stimulation in CLL B cells.** Percentage was evaluated as described in Material and Methods. BCR-unresponsive cells exhibit a BCR-dependent CXCR4 decrease below or equal to 5% (10).



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Il est aujourd'hui bien établi qu'une signalisation émanant du BCR joue un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la LLC [213, 229, 254, 295]. Les travaux effectués dans notre laboratoire ont renforcé cette notion en démontrant que la réponse des cellules B-LLC suite à une stimulation antigénique prolongée *in vitro* induit un avantage de survie des cellules répondeuses (R) par rapport aux cellules non-répondeuses (NR). Cette survie accrue a permis de distinguer deux groupes de patients et s'est révélée être liée à la présence ou non de facteurs de mauvais pronostic de la LLC [199, 214]. Dans ce contexte, mes travaux de recherche translationnelle renforcent l'intérêt clinique de l'étude de la survie des cellules B-LLC mesurée *in vitro* en démontrant qu'elle est inversement corrélée à la survie globale mesurée chez les patients (Article 1). Cet article, ainsi que les deux manuscrits qui suivent, révèlent également que cet avantage de survie des cellules R est associé à des niveaux de phosphorylation et/ou d'activation de différents effecteurs impliqués dans les voies de signalisation du BCR (Syk, PLC $\gamma$ 2, PI3K, NFAT et CXCR4). L'ensemble de ces résultats suggère l'existence de divers biomarqueurs fonctionnels de la survie et/ou de la migration des cellules de LLC. En plus d'être des cibles thérapeutiques intéressantes, ils expliqueraient en partie les mécanismes moléculaires des drogues actuellement utilisées dans le traitement de la LLC.

### 1. Intermédiaires de la signalisation de la voie du BCR et survie des cellules B-LLC

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base des différences de survie des cellules B-LLC stimulées, l'article 1 étudie tout d'abord les niveaux d'expression de plusieurs composants du complexe de signalisation du BCR. Dans un premier temps, l'avantage de survie des cellules R stimulées a été lié au niveau d'expression de l'immunoglobuline M du BCR lui-même. Conformément à la littérature, nos résultats montrent une plus faible expression des IgM à la surface des cellules B-LLC comparée aux cellules B normales [296]. Ce plus faible taux d'expression est expliqué par un défaut de glycosylation des chaînes  $\mu$  et Ig $\alpha$  qui empêche l'assemblage correct du BCR à membrane plasmique [222]. De plus, notre étude démontre que l'expression des IgM est plus forte à la surface des cellules R comparée aux cellules NR. Ces résultats corroborent en partie d'autres données de la littérature qui démontrent qu'un faible pourcentage de BCR immatures est exprimé à la surface des B-LLC et qu'il est d'autant plus élevé dans les cellules des patients UM

[221]. Sachant que notre cohorte de patients R est majoritairement constituée de patients UM [199], l'expression plus importante d'IgM dans les cellules R correspondrait à des formes immatures du BCR. Cette forme immature n'étant pas internalisée en réponse à une stimulation antigénique, elle serait responsable du signal tonique induisant la survie des B-LLC [219, 221]. Elle expliquerait le plus haut taux de phosphorylation de certains intermédiaires de la signalisation en aval du BCR observé dans les cellules non stimulées des patients R. A l'inverse, notre cohorte de patients NR, qui est majoritairement constituée de patients M, présente un niveau d'expression d'IgM de surface statistiquement plus bas. Cette baisse s'expliquerait par l'expression d'une chaîne CD79b tronquée résultant d'un épissage alternatif [223]. Ce défaut d'expression serait causé par des mutations du gène codant pour les chaînes CD79b survenues en même temps que les SHM et donc détectables dans les cellules M uniquement [224]. Le CD79b étant essentiel au transport des Ig à la membrane [223], l'expression de la forme tronquée dominante dans les B-LLC NR contribuerait à la plus faible expression d'IgM dans ces cellules.

Pour mieux comprendre la signalisation différentielle en aval du BCR entre les cellules R et NR, le niveau d'expression des premiers effecteurs de ce récepteur ont été également analysés. Nos résultats montrent une surexpression de Syk dans les cellules B-LLC comparées aux cellules B normales, indépendamment d'une translocation chromosomique. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature décrivant une régulation positive du gène *SYK* [230] et une surexpression de la protéine Syk dans les cellules B-LLC [257], indépendamment de mutations somatiques ou ponctuelles [235, 236]. De plus, nos travaux révèlent que les niveaux d'expression de Syk et de l'autre membre de la famille, la protéine Zap70, sont statistiquement plus élevés dans les cellules R comparées aux NR. Ainsi, les niveaux d'expression de ces deux effecteurs précoces participeraient à un seuil de réponse du BCR atteint uniquement dans les cellules R.

Une étude de l'activation de ces effecteurs précoces révèle que les niveaux de phosphorylation de Syk, en réponse ou non à une stimulation antigénique, sont plus importants dans les cellules R par rapport aux cellules NR. Ces résultats peuvent être expliqués par l'expression à la surface d'IgM UM, majoritairement exprimées dans le groupe des patients R, et décrits comme poly-réactifs et donc plus facilement activables [208]. Il est intéressant de noter que les taux de phosphorylation de Syk basal et induit par une stimulation du BCR ne sont pas affectés en présence de Zap70. Ces résultats sont en accord avec l'affinité plus faible de Zap70 pour le BCR, ainsi que son activité kinase cent fois moins élevée par rapport à celle décrite de Syk [74, 80]. De plus, nos résultats montrent que l'expression de phospho-Zap70 n'est pas détectable en réponse à une



stimulation antigénique des cellules B des groupes NR et R. Ces résultats sont cohérents avec une contribution de Zap70 dans l'augmentation de la signalisation dépendante du BCR qui est liée à son domaine SH3 et non à son activité kinase [251]. Zap70 agirait donc plutôt comme un adaptateur pour faciliter le recrutement d'autres effecteurs [249-251, 254].

Sur la base de la phosphorylation différentielle de Syk entre cellules NR et R, nos derniers travaux (manuscrit 2 en préparation) s'intéressent plus précisément à l'activation de Syk dans les cellules leucémiques. Ils montrent une dynamique différentielle de modifications par phosphorylation de Syk entre les cellules B normales, NR et R en réponse à différents temps de stimulation antigénique. En effet, les cellules normales, qui arborent un faible niveau de phosphorylation basale de Syk, montrent une forte augmentation transitoire suite à 2 minutes de stimulation du BCR. En revanche, les cellules B-LLC présentent une augmentation de la phosphorylation de Syk moins importante en réponse à l'engagement de leur BCR que celle observée dans les cellules normales. Cette différence est probablement liée à la phosphorylation basale de Syk qui plus est élevée dans les cellules leucémiques. Elle serait causée par l'existence 1) d'un signal résiduel provenant d'une stimulation chronique des cellules B-LLC fraîchement purifiées par un antigène endogène, 2) d'un signal tonique initié sans antigène [219, 297] ou 3) d'un signal autonome indépendant de l'antigène [227]. Quelque soit le mécanisme d'activation de la voie du BCR mis en jeu, il conduirait à un déséquilibre entre l'activation de certaines kinases et/ou l'inactivation de certaines phosphatases [42, 94] qui aboutirait à un seuil d'activation de Syk plus élevé. Nos travaux montrent que la réponse des B-LLC à un anti-IgM mesurée est hétérogène, et d'autant plus dans les cellules R. Cette hétérogénéité peut être expliquée par le fait que certaines cellules B-LLC n'expriment que des IgM mais la plupart d'entre elles exprime à leur surface des IgM et des IgD [298] ; or la signalisation en aval des IgD n'est que transitoire et échoue à induire la survie ou la prolifération cellulaire [219] [299]. De même, les Ig membranaires des patients les plus progressifs peuvent avoir subi un « switch » et être devenus des IgG [300]. Les cellules expriment alors uniquement des IgG ou un mélange d'IgM et d'IgG [192]. Cependant, les cellules IgG<sup>+</sup> restent très rares donc nous n'utilisons que des anti-IgM pour la stimulation *in vitro* et les cellules B-LLC répondent en fonction de la proportion d'IgM qu'elles expriment. Par ailleurs, il a été montré récemment que les BCR de plus de 30% des patients LLC, préférentiellement les UM, expriment des régions HCDR3 stéréotypées capables de reconnaître des épitopes intrinsèques [227]. Ceci a pour conséquence d'activer un signal tonique qui pourrait diminuer le seuil d'activation de ces cellules

en vue de la liaison d'un antigène extrinsèque tel que l'anti-IgM [225] et pourrait expliquer la meilleure réponse de ces cellules.

Une analyse de la distribution subcellulaire de Syk montre que cette kinase existe préférentiellement dans la fraction cytoplasmique de toutes les cellules leucémiques. En revanche, seule une portion du pool membranaire présent dans les cellules R est phosphorylée en réponse à une stimulation antigénique, suggérant une activation de Syk suite à sa liaison aux motifs ITAMs du BCR et une plus grande capacité d'interaction de Syk à former des complexes à la membrane dans ces cellules. Une étude des sites de phosphorylation spécifiques de Syk dans les cellules B leucémiques des patients non-répondeurs et répondeurs, nous a permis d'identifier des différences notables :

1) La tyrosine 352 (Y<sup>352</sup>) est décrite dans le contexte des cellules B normales pour participer à la transition de la forme auto-inhibée à la conformation active de Syk [61] et pour créer des sites de liaison à des protéines contenant des domaines SH2 [59]. Dans les cellules B-LLC, le résidu Y<sup>352</sup> est proposé pour refléter une activation enzymatique de Syk [232]. Nos résultats montrent une dynamique de phosphorylation de cet acide aminé qui tend à être similaire dans les B normales et les deux groupes de cellules B-LLC. Ces résultats sont en accord avec nos précédentes données qui ne montrent pas de différence significative de l'augmentation du niveau de phosphorylation du résidu 352 en réponse à 10 minutes de stimulation du BCR avec un anti-IgM entre les cellules des patients non-répondeurs et des répondeurs [294]. Dans les conditions basales et particulièrement dans les cellules B-LLC, nos western blots hybridés avec l'anticorps anti-pY<sup>352</sup>Syk révèlent un signal indiquant que Syk est constitutivement phosphorylée et activée comme elle l'est décrite en réponse à un signal tonique où elle joue un rôle dans la survie des cellules B-LLC [232, 233].

2) Les tyrosines 525 et 526 (YY<sup>525/526</sup>), situées dans la boucle d'activation du domaine kinase, contribuent à une conformation activée de Syk (Bohnenberger, Oellerich et al. 2011; Gradler, Schwarz et al. 2013) et leur remplacement par deux résidus phénylalanines conduit à des défauts de signalisation du BCR en réponse à une stimulation antigénique des cellules B normales (Geahlen, R. L. 2009). Contrairement aux cellules B normales dans lesquelles nous observons bien une augmentation transitoire du niveau de phospho-YY<sup>525/526</sup> Syk à 2 minutes de stimulation, les cellules B-LLC ne présentent aucune variation de ce taux suite à une stimulation antigénique, suggérant que l'absence de modification par phosphorylation de ces deux résidus puisse être un biomarqueur des cellules B-LLC. Ces résultats sont en désaccord avec d'autres travaux (Carsetti, L, 2009) qui décrivent l'absence de modification par phosphorylation des YY<sup>525/526</sup> de Syk dans les

lysats cellulaires de B-LLC non-stimulées et une élévation de phospho- YY<sup>525/526</sup> suite à une stimulation antigénique. A ce jour, aucune hypothèse rationnelle n'a pu être émise pour expliquer cette divergence car le matériel de base est identique, à savoir les cellules B-LLC et l'anticorps de stimulation. Seuls les tampons de lyse des cellules leucémiques diffèrent, suggérant que les pools de Syk et de ses formes phosphorylées extraits ne soient pas identiques.

3) Parmi les anticorps anti-phospho-Syk disponibles commercialement, il nous restait à tester la phosphorylation du résidu tyrosine 323 (Y<sup>323</sup>). Dans le contexte des cellules B normales, cette Y<sup>323</sup> est un site majeur d'autophosphorylation ou de phosphorylation par les kinases de la famille Src. Une fois phosphorylée, elle est considérée pour inhiber la signalisation induite par un antigène si elle sert de site d'ancrage à c-Cbl et/ou pour réguler positivement la signalisation du BCR si elle est reconnue comme site d'accrochage à PI3K [59]. L'étude de la phosphorylation de ce résidu révèle une augmentation transitoire dans les cellules B normales, une élévation de plus faible amplitude mais persistante dans les cellules B répondeuses et aucune variation dans les cellules non-répondeuses des patients LLC. Ces données suggèrent l'implication fonctionnelle de la phosphorylation de la Y<sup>323</sup> dans l'avantage de survie des cellules de LLC des patients répondeurs et désignent ce résidu phosphorylé comme potentiel biomarqueur de stratification de la LLC. Les mécanismes moléculaires sous-jacents consisteraient à maintenir l'interaction entre Syk et PI3K qui aboutirait à l'activation de cette dernière requise à l'activation des voies NFAT, NF-κB et Akt impliquées dans la survie cellulaire, dans la résistance à l'apoptose [157, 175, 301] et l'internalisation du CXCR4 (manuscrit 3).

4) Il est intéressant de noter que l'étude du statut de phosphorylation de Syk dans les cellules B normales et de LLC tend à montrer une phosphorylation basale plus forte dans les cellules B leucémiques qui est probablement causée par l'activation constitutive de Syk et Lyn qui ciblent respectivement les tyrosines de la boucle d'activation du domaine kinase (Y<sup>525/526</sup>) et les tyrosines de l'interdomaine B (Y<sup>323</sup> et Y<sup>352</sup>) [35, 82, 232]. Une comparaison des différents niveaux de phosphorylation de Syk, à nombre de cellules égal, permettra de vérifier cette tendance. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques bloquant l'activité kinase de Syk ou de Lyn permettra de déterminer la protéine à l'origine de cette modification dans les cellules B-LLC.

Les profils de phosphorylation (voir résultats complémentaires), ainsi que les dynamiques de phosphorylation de Syk qui diffèrent entre les cellules NR et R, suggèrent l'association de Syk modifiée à différents effecteurs. Sur la base des protéines connues pour interagir avec Syk dans la voie de signalisation du BCR des cellules B normales [71, 122, 302], nous nous sommes focalisés sur

l'identification d'un interactome autour de Syk dans les cellules B-LLC. Nos résultats montrent pour la première fois dans les cellules B leucémiques une interaction entre Syk et des régulateurs positifs, tels que BLNK, Btk et PLC $\gamma$ 2, ainsi que des régulateurs négatifs, comme Shp1 et c-Cbl. Ces complexes Syk – régulateurs, qui existent à l'état basal, se renforcent au cours de la stimulation antigénique dans les cellules R uniquement, et ce indépendamment des niveaux d'expression de Syk et de ses partenaires dans les cellules NR et R. Dans les cellules répondeuses, nous nous attendions à un complexe membranaire maintenu par le domaine PH de Btk [123, 126, 129] et dans lequel Btk serait à la fois la cible de Syk en présence de BLNK [126] et la kinase activatrice de p<sup>759</sup>PLC $\gamma$ 2 [141]; Vav1 rejoignant ce complexe où elle serait phosphorylée par Syk [149]. En réponse à une stimulation antigénique, nos résultats révèlent bien une augmentation du niveau de phosphorylation de Btk (données préliminaires non publiées) associée à celui de PLC $\gamma$ 2 dans les cellules répondeuses uniquement (article 1 et manuscrit 2), suggérant que le complexe Syk/BLNK/Btk observé dans ces cellules est fonctionnel. Cette élévation du taux de PLC $\gamma$ 2 propose que la boucle d'amplification de la signalisation du BCR régulée par Syk dans les cellules B normales [40] existe uniquement dans les cellules B-LLC des patients R. Cependant, notre analyse de la distribution subcellulaire des partenaires de Syk n'a pas permis de détecter la présence de régulateurs positifs dans le compartiment membranaire. Il serait donc intéressant de prouver l'existence d'un tel complexe en augmentant la quantité de matériel utilisable ou en analysant la distribution de ces régulateurs positifs par une approche de microscopie.

A l'inverse des effecteurs positifs, les régulateurs négatifs associées à Syk comme la phosphatase Shp1 et l'ubiquitine ligase E3 c-Cbl montrent un signal membranaire après fractionnement subcellulaire. La présence de ces régulateurs négatifs dans des quantités détectables dans un compartiment où Syk existe à l'état phosphorylé suggère que ces régulateurs négatifs contrôlent très rapidement le niveau de phosphorylation/et ou d'activation de Syk dans la signalisation précoce du BCR. La présence anormale de Shp-1 à la membrane dans les cellules B-LLC [246] et son association au co-récepteur CD5 exprimé par les cellules leucémiques [246] impliqueraient cette phosphatase dans l'activation de Mcl-1 qui conduit à une résistance à l'apoptose des cellules malignes. Cependant, aucune modification du niveau de phosphorylation des effecteurs Lyn et Syk n'a été observée [246]. Concernant c-Cbl, elle est surexprimée et existe sous une forme hypo-phosphorylée (Y<sup>700</sup>) dans les cellules B-LLC [273]. Sur la base de la régulation négative de cette forme de c-Cbl sur la fonction de Zap70 dans les cellules T [273], nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle c-Cbl agirait comme un régulateur positif des complexes formés

par Syk par son rôle d'adaptateur dans les cellules B-LLC. Ce rôle a déjà été suggéré dans des modèles de cellules B immatures de souris ou de poulet où Cbl-b serait déterminant dans la formation du complexe Btk/BLNK/PLC $\gamma$ 2 nécessaire à la mobilisation calcique [303]. Par ailleurs, Shp-1 déphosphorylant Cbl dans des modèles de monocytes/macrophages murins ou humains [304, 305], sa présence dans nos complexes Syk suggérerait une déphosphorylation de Cbl que nous pourrions mesurer par l'approche phosphoflow. Ces résultats seraient informatifs sur d'éventuels défauts d'inactivation ou de dégradation de Syk qui expliqueraient en partie son fort taux de phosphorylation ainsi que sa stabilité dans les cellules B-LLC des patients R.

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, la formation des complexes Syk est liée à une activation de PLC $\gamma$ 2 (article 1 et manuscrit 2) qui se traduit par une réponse calcique (article 1) dans les cellules R stimulées uniquement, renforçant la notion que seules ces cellules sont capables d'atteindre un seuil d'activation. La réponse calcique prolongée suggère une activation du facteur de transcription NFAT [175] et plus particulièrement de NFAT2. Ce dernier est exprimé dans les cellules B normales et surexprimé dans les cellules B-LLC [306, 307]. Nos résultats montrent également une expression transcriptionnelle de NFAT2 plus importante dans les cellules B-LLC que dans les cellules B normales et associée à une localisation nucléaire suggérant une activation constitutive de ce facteur de transcription décrit pour être impliqué dans le phénomène d'anergie [197, 276]. Nos résultats montrent pour la première fois que les cellules R sont capables de reverser cet état d'anergie par une élévation de la capacité de liaison à l'ADN de NFAT2 en réponse à une stimulation antigénique. Ainsi, les cellules R qui existent dans un état pré-activé en absence de stimulation sont seules capables de dépasser ce seuil d'activation en réponse à un antigène. L'activation de NFAT2 dans les cellules R suite à une stimulation antigénique se traduit par un avantage de survie cellulaire mettant en œuvre la cascade Syk/PLC $\gamma$ 2/NFAT2. La pertinence clinique de cette voie de signalisation du BCR a été démontrée en corrélant le pourcentage de survie des cellules B-LLC stimulées de façon soutenue *in vitro* de chaque patient à leur survie globale et sans progression.

## **2. Intermédiaires de signalisation de la voie du BCR et migration des cellules B-LLC.**

La stimulation antigénique *ex-vivo* est impliquée non seulement dans la survie accrue des cellules B-LLC du groupe des patients répondeurs mais également dans la migration des cellules

leucémiques dans les compartiments ganglionnaire et médullaire [192, 216]. Dans ce contexte, les travaux de notre laboratoire ont montré qu'une stimulation antigénique soutenue *in vitro* permet de distinguer deux groupes de patients LLC en termes de diminution de l'expression membranaire du CXCR4. Cette diminution est corrélée à la baisse des capacités migratoires des cellules leucémiques en réponse à une stimulation par le SDF1 et liés à la survie sans progression des patients LLC [214]. En revanche, les mécanismes moléculaires mis en jeu suite à l'engagement du BCR et aboutissant à la disparition membranaire du CXCR4 étaient peu définis. Nous nous sommes donc intéressés aux voies de signalisation du BCR impliquées dans l'internalisation du CXCR4 (manuscrit 3 en révision). Sachant que cette internalisation en réponse à un anti-BCR implique les PKCs dans un modèle de cellules B de poulet [308], nous avons utilisé un jeu d'inhibiteurs (Gö6983, Gö6976, GF109203X et CID755673) ayant des spécificités différentes vis-à-vis des PKCs et PKDs. Nos résultats démontrent pour la première fois que l'internalisation du CXCR4 en réponse à une stimulation antigénique des cellules B-LLC est un processus dépendant des PKDs. La détermination des isoformes des PKD révèle que seules les PKD2 et PKD3 sont exprimées dans les cellules B-LLC, en accord avec l'expression majoritaire de PKD2 dans les tissus lymphoïdes la présence de PKD3 et l'absence de PKD1 dans ces mêmes cellules [309, 310]. Pour déterminer l'isoforme impliquée fonctionnellement dans l'internalisation du CXCR4, un traitement par le CID des cellules B-LLC n'est pas suffisant car ce composé inhibe sans distinction les trois isoformes des PKDs [311]. Une inhibition spécifique par l'utilisation d'une stratégie d'interférence à ARN (siRNA) ou l'expression de formes mutées constitutivement actives de ces isoformes dans les cellules B-LLC nous permettraient de répondre à cette question.

L'implication fonctionnelle des PKDs suite à une stimulation antigénique qui aboutit à l'internalisation du CXCR4 dans les cellules de LLC des patients R passe par l'augmentation du niveau de phosphorylation des résidus sérines 744 et 748 situées dans la boucle d'activation de la kinase. Une corrélation a été établie entre ce niveau de phosphorylation des PKD et le pourcentage de diminution du CXCR4 membranaire en réponse à l'engagement du BCR chez les patients répondeurs. En revanche, dans les cellules des patients non-répondeurs, il n'existe pas d'élévation du taux de phosphorylation des PKDs ni d'internalisation du CXCR4 après stimulation antigénique, suggérant une altération de la fonction des PKDs dans ces cellules. Cette hypothèse a été réfutée par l'apparition des phospho-PKD et l'endocytose du CXCR4 dans ces mêmes cellules traitées avec le PMA. L'ensemble de ces données suggère que les cellules non-répondeuses sont pourvues d'une déficience du signalosome précoce du BCR en accord avec les résultats publiés par notre équipe

([199], article 1, manuscrit 2). La double phosphorylation sur les SS<sup>744/748</sup> suite à une stimulation antigénique précède la phosphorylation de la sérine 916 des PKDs qui est diminuée en présence du CID. Ces données sont en accord avec celles proposant un modèle dans lequel l'activation des PKDs nécessite leur phosphorylation sur les résidus sérines 744 et 748 puis sur la sérine 916, considérée comme un site d'autophosphorylation et reflétant l'activation des PKDs [312, 313].

En réponse à une stimulation du BCR ou à un traitement avec le PMA, l'internalisation du CXCR4 dépend de son domaine C-terminal qui contient un motif S<sub>324</sub>S<sub>325</sub>KILL [308] et de la phosphorylation des résidus S<sup>324</sup> et S<sup>325</sup> [314, 315]. Dans ce contexte, notre analyse "*in silico*" de la séquence humaine de CXCR4 a identifié les sérines 324 et 325 comme des résidus cibles des PKDs. Pour la première fois, nos données démontrent que le CXCR4 est la cible des PKDs dans les cellules B-LLC répondeuses et stimulées.

L'identification de la kinase responsable de l'activation des PKD dans les cellules B-LLC après une stimulation soutenue du BCR, nous a conduit aux PI3Ks. Si les PKCs sont généralement identifiées comme telles dans différents modèles de cellules B après une stimulation courte du BCR [316, 317], nos résultats obtenus avec le panel d'inhibiteurs des PKC démontrent que celles-ci ne sont pas impliquées après une stimulation longue du BCR. Ces résultats, apparemment contradictoires, peuvent être expliqués par une phosphorylation initiale des PKD, qui est dépendante des PKC, et qui devient indépendante des PKC après une exposition longue à l'antigène [312]. Sachant que PI3K a été identifiée comme régulant l'activité des PKD après stimulation du BCR dans un modèle de cellules B murines [318], nous avons vérifié cette hypothèse dans notre modèle en utilisant un inhibiteur pan-PI3K, le LY294002, et un inhibiteur spécifique de la PI3K- $\delta$ , le Cal-101. Nos résultats démontrent que l'activation des PKDs, qui conduit à l'internalisation du CXCR4 en réponse à un engagement du BCR, est régulée par l'activité kinase des PI3K.

### **3. Biomarqueurs fonctionnels de l'évolutivité et cibles thérapeutiques de la LLC.**

L'ensemble de nos données suggère que certains effecteurs de la signalisation du BCR soient des biomarqueurs fonctionnels de l'évolutivité de la LLC et d'éventuelles cibles thérapeutiques. De plus, nos travaux décrivent des mécanismes moléculaires impliqués dans la survie et la migration

différentielles des cellules B-LLC des 2 groupes de patients qui permettent d'expliquer une partie de l'action des inhibiteurs utilisés actuellement dans la LLC.

Nos résultats démontrent qu'une stimulation antigénique *in vitro* aboutit à l'avantage de survie des cellules R et que ce test *in vitro* est inversement corrélé à la survie des patients. Cette réponse à l'antigène découle de l'activation de la voie de signalisation impliquant Syk, PLC $\gamma$ 2 et NFAT. L'implication fonctionnelle de Syk et NFAT a été démontrée sur la perte de l'avantage de survie cellulaire dans les cellules stimulées et traitées avec un inhibiteur ciblant l'activité kinase de Syk, le R406 (manuscrit 2), et avec un inhibiteur bloquant l'interaction entre la calcineurine et NFAT, le Vivit (article 1). Un traitement des cellules B-LLC avec le R406 provoque non seulement une diminution du niveau de phosphorylation de Syk lui-même mais également une diminution de l'activation de PLC $\gamma$ 2 qui se traduit par une perte de l'avantage de survie des cellules R stimulées. Sachant que l'action de Syk peut passer par son activité kinase et/ou son activité adaptatrice [71], il serait intéressant de déterminer l'impact du R406 sur l'assemblage de son interactome dans les cellules B leucémiques et d'identifier si Syk a un rôle de kinase ou d'adaptateur dans le recrutement des effecteurs positifs et négatifs au cours de la stimulation. Un blocage de la formation des complexes *in vitro* expliquerait en partie le mécanisme d'action du FosD *in vivo* et sa plus grande efficacité chez les patients progressifs [257]. Quant au peptide Vivit développé comme alternative aux traitements par la Cyclosporine A ou le Tacrolimus utilisés largement en clinique [319], il pourrait être une des options thérapeutiques dans la LLC en reversant le phénotype répondeur en non-répondeur des patients, conformément à nos résultats *in vitro*. Par ailleurs, nos données montrent que PLC $\gamma$ 2 est un biomarqueur fonctionnel de l'avantage de survie cellulaire en réponse à une stimulation antigénique des cellules de LLC. Notre étude du niveau d'activation de PLC $\gamma$ 2 effectuée sur une plus grande cohorte d'échantillons de patients LLC tend à démontrer que PLC $\gamma$ 2 soit un biomarqueur de stratification de la LLC. Cependant, si il existe des inhibiteurs des PLC (le L-108 et le U-73122) [320], aucun d'entre eux ne cible spécifiquement l'isoforme  $\gamma$ 2.

D'autre part, nos données démontrent l'implication des PKDs et des PI3Ks (dont l'isoforme  $\delta$ ) dans l'internalisation du CXCR4 suite à une stimulation du BCR (manuscrit 3). Dans ce contexte, notre laboratoire a précédemment démontré que la diminution du CXCR4, médiée par une stimulation du BCR, est associée à une diminution des capacités de migration *in vitro* des cellules B-LLC en réponse au CXCL12 [214]. De plus, cette diminution du CXCR4 est corrélée à la survie sans progression des patients LLC [214]. L'ensemble de nos résultats suggère qu'une stimulation



antigénique des cellules B-LLC des patients progressifs provoquerait une rétention ganglionnaire dépendante de la voie PI3K- $\delta$ /PKD/CXCR4 qui favoriserait leur survie dans ce microenvironnement. Ces résultats expliqueraient en partie le mécanisme d'action de l'Idelalisib, qui bloque la PI3K- $\delta$  *in vivo* et qui entraîne une redistribution des cellules B-LLC et une diminution du volume ganglionnaire, suggérant que l'action de cette drogue passe par une réduction des interactions retenant les B-LLC dans les ganglions [208]. Les données du manuscrit 3 révèlent que les PKD2/3 pourraient également être des biomarqueurs fonctionnels de l'évolutivité de la maladie. Cependant, des travaux complémentaires sont nécessaires pour le prouver. Une étude sur un plus grand nombre d'échantillons de patients LLC qui quantifierait le taux de phosphorylation des PKDs suite à une stimulation antigénique par une approche phosphoflow permettrait d'établir une corrélation entre ce taux de phosphorylation et le temps de progression de chaque patient. De plus, nos résultats proposent PKD2/3 comme cibles potentielles dans le traitement de la LLC. En effet, un traitement par le CID pourrait bloquer la diminution de la migration des cellules B-LLC répondeuses après stimulation antigénique *in vitro* et pourrait également inhiber la rétention ganglionnaire des cellules B-LLC *in vivo* chez les patients les progressifs.



## ANNEXES



# Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9

Dennis Lindau\*<sup>1</sup>, Julie Mussard\*<sup>2</sup>, Britta J. Wagner<sup>1</sup>, Matthieu Ribon<sup>2</sup>, Viktoria M. Rönnefarth<sup>1</sup>, Maude Quettier<sup>3</sup>, Ivan Jelcic<sup>1</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>2,4</sup>, Hans-Georg Rammensee<sup>1</sup> and Patrice Decker<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunology, Institute for Cell Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

<sup>2</sup> University of Paris 13, Sorbonne Paris City, Bobigny, France

<sup>3</sup> University of Paris 13, Sorbonne Paris City, INSERM U978, Bobigny, France

<sup>4</sup> Rheumatology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France

Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) represent one of the first lines of defense against pathogens. TLR9 is normally expressed in endosomes/lysosomes where it is activated by pathogen-derived DNA. Here we show that freshly isolated human and mouse primary PMNs express TLR9 at the cell surface *ex vivo*. Moreover, surface TLR9 expression is upregulated upon activation of PMNs with different stimuli and not only TLR9 agonists. Importantly, surface TLR9 is processed, active, and functional. TLR9 ligands, oligonucleotides containing unmethylated CpG motifs, indeed bind to surface TLR9 and binding was strongly observed at the cell surface of human cells expressing surface TLR9 and at the surface of WT but not TLR9-deficient mouse PMNs. Finally, CpG oligonucleotides cross-linked onto a solid phase and having no access to intracellular TLR9 are able to trigger cell surface TLR9 and induce neutrophil activation, even when endosomal acidification is inhibited. This is the first demonstration of a functional TLR9 expressed at the cell surface of human primary cells. This pathway may be triggered when pathogen-derived TLR9 ligands cannot reach the endosome, offering a rescue mechanism for neutrophil activation.

**Keywords:** Activation · Cell-surface expression · Functionality · Neutrophils · TLR9



See accompanying Commentary by Miyake



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

## Introduction

Polymorphonuclear cells (PMNs) are the first cells recruited at inflammation sites. They play a central role in host defense and their accumulation at sites of acute infection or tissue injury is a critical component of inflammation [1]. PMNs have recently been

reported to induce chemotaxis of the pro-inflammatory Th17 lymphocytes [2] and to stimulate plasmacytoid dendritic cells (DCs) to produce IFN- $\alpha$  [3, 4]. Importantly, PMNs have been suggested to link innate and adaptive immunity [5–7] by influencing, e.g. DCs. PMN activation may thus favor adaptive immunity but may also represent a double-edged sword in promoting responses that may lead to tissue injury or autoimmunity.

**Correspondence:** Dr. Patrice Decker  
e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

\*These authors contributed equally to this work.

TLR9 is activated in endosomal/lysosomal compartments by unmethylated CpG motifs present in pathogen-derived DNA [8] as well as in synthetic oligonucleotides (ODNs). Nevertheless, vertebrate DNA can also trigger TLR9 under certain circumstances although TLR9-independent pathways are triggered in addition [9]. For instance, mammalian DNA activates innate immunity in a TLR-independent manner [10]. Moreover, natural phosphodiester ODNs lacking CpG motifs activate TLR9 upon enforced endosomal translocation [11]. Actually, the sugar backbone of natural phosphodiester DNA has been shown to determine recognition by TLR9 [12]; the rules governing TLR9 activation are therefore complicated. Furthermore, all the aforementioned results refer to intracellular TLR9. An emerging paradigm in innate immunity is thus the intracellular expression of TLR9 [13] because nucleic acids have to be released from microbial particles, concentrated or modified in acidified endosomal–lysosomal compartments [14, 15], before receptor–ligand interactions can take place with ectodomain-cleaved activated TLR9 [16, 17]. ODNs containing CpG motifs (CpG-ODN) are transported upon receptor-mediated endocytosis [18]. TLR9 signals upon UNC93B1-aided and physical association-mediated translocation from the ER to endolysosomes where it interacts with TLR9 agonists [19, 20]. It has been suggested that TLR9 is sequestered intracellularly to exclude recognition of extracellular host-derived nucleic acids, thus preventing autoimmune responses [21]. The recruitment of CpG-ODNs to endosomal TLR9 is enhanced by the soluble cofactor granulin [22], although granulin is not absolutely required for cell activation by CpG-ODNs. Endosomal compartmentalization of TLR9 may thus reflect an evolutionary strategy to avoid TLR9 activation by self-DNA and localization of the nucleic acid sensing TLRs is critical in discriminating between self and nonself nucleic acids.

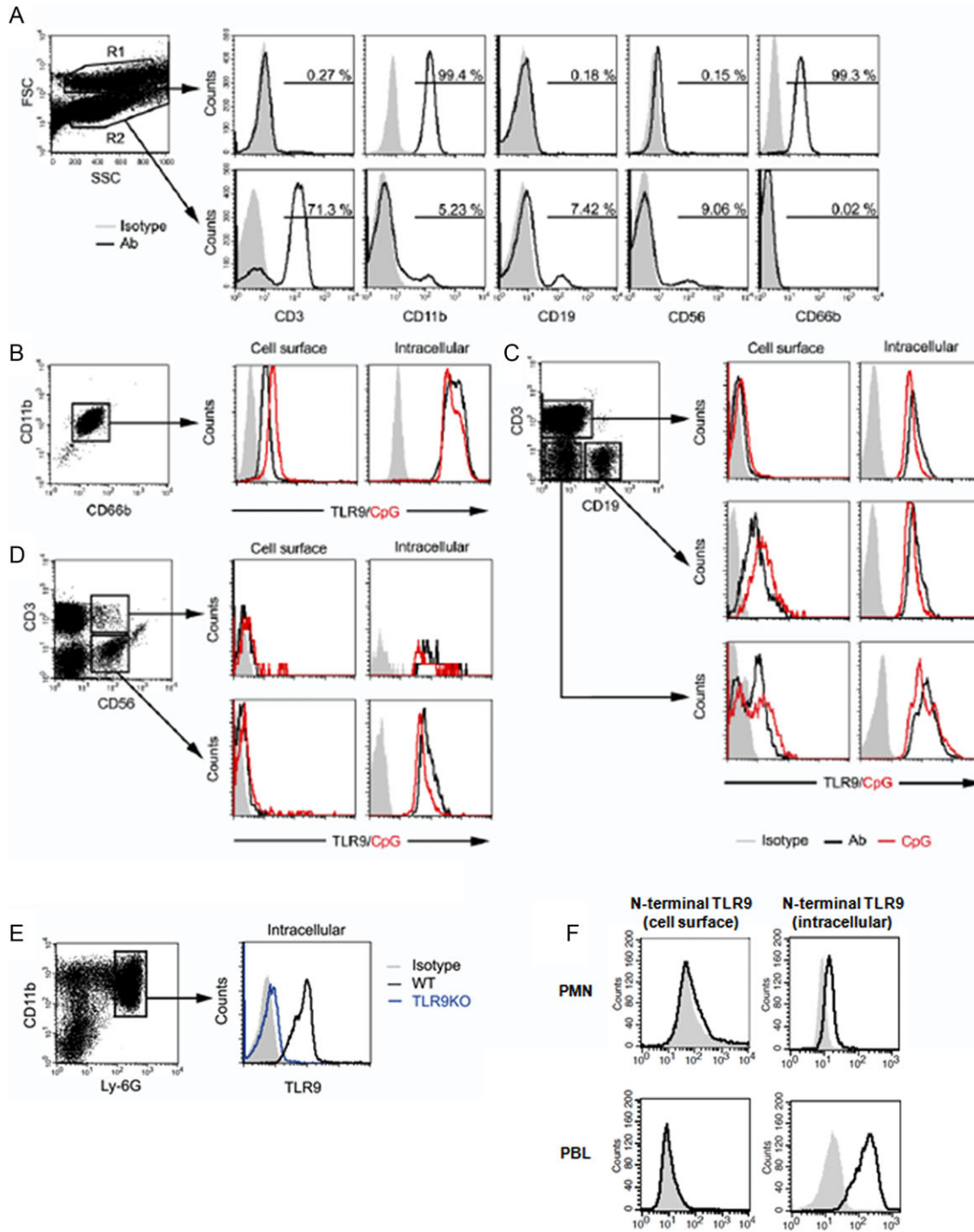
PMNs recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on foreign organisms by expressing TLRs 1–10, except TLR3 [23]. Particularly, PMNs express TLR9 and respond to TLR9 ligands, leading to cytokine secretion and CD11b upregulation, although the subcellular localization of TLR9 in PMNs has not been investigated. A few studies have demonstrated that specialized human primary immune cells such as B lymphocytes [24–27], tonsil cells [28], and monocytes [29], as well as intestinal epithelial cells [30], might express TLR9 at the cell surface, although the functionality of TLR9 expressed on the surface of human cells has not been demonstrated and its significance is unclear. Antigen-presenting cells (APCs) represent therefore major cell populations expressing cell surface TLR9. Nevertheless, human primary PMNs have not been studied so far. Moreover, only studies using engineered cell lines and expressing a chimeric cell surface TLR9 could clearly show that surface TLR9 responds to some of its ligands and even to mammalian DNA [21]. Such a demonstration is not available for primary cells expressing a natural TLR9. We therefore investigated whether human and mouse primary PMNs express a cell surface TLR9 and whether this receptor can trigger an activation signal upon binding and recognition of its agonist in the extracellular milieu. Using an approach combining immunological and microscopic techniques, we investigated the cellular distribution

and the functionality of TLR9 in lymphoid and myeloid cells. We demonstrate that surface TLR9 interacts with CpG ODN, leading to the activation of PMNs, and that surface expression of TLR9 is enhanced upon PMN activation.

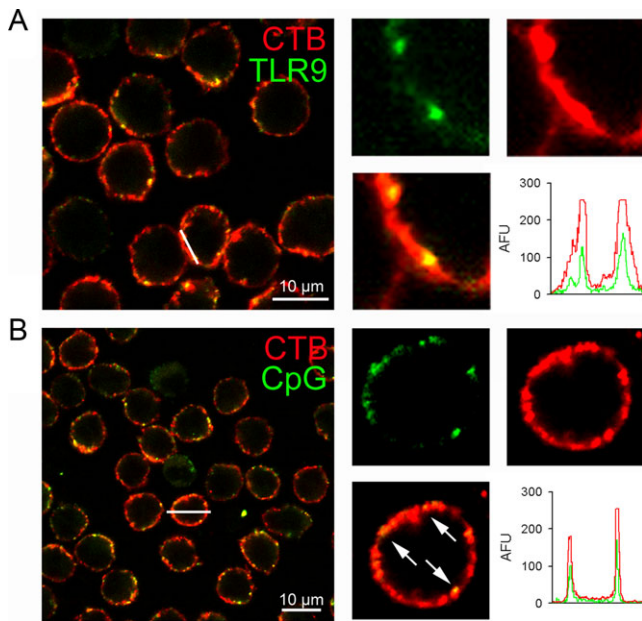
## Results

### Human PMNs spontaneously express TLR9 at the cell surface

To investigate the *ex vivo* expression of TLR9 at the surface of non-stimulated cells, we first analyzed simultaneously all the human leukocyte populations in several independent healthy donors. Cells were prepared by dextran centrifugation and the two layers containing either PBMCs or PMNs were harvested and mixed, yielding a leukocyte population depleted from erythrocytes and platelets. As shown in Figure 1A, the R1 gate contained only PMNs (CD66b-positive cells), whereas the R2 gate contained essentially T lymphocytes, B lymphocytes, NK/NKT cells, and a few monocytes. Freshly isolated cells were then stained for cell surface or intracellular TLR9 using a specific mAb (clone 5G5). Focusing on gate R1, we identified cell-surface expression of TLR9 on PMNs (Fig. 1B), all the cells being double-positive for CD66b and CD11b. Gating on R2, and as already reported, B lymphocytes also express TLR9 at the cell surface (Fig. 1C, middle panel). Similarly, gating on CD3<sup>−</sup>CD19<sup>−</sup> cells, we confirmed that part of the monocytes also express cell surface TLR9 (Fig. 1C, lower panel). Interestingly, no cell surface TLR9 was detected on T lymphocytes (Fig. 1C, upper panel), NK cells, or NKT cells (Fig. 1D, lower and upper panels, respectively). However, all the cell types analyzed expressed TLR9 intracellularly and intracellular expression was stronger than surface expression. No binding of the isotype control was observed, indicating that the staining was TLR9 specific. The specificity of the TLR9 staining was confirmed by comparing BM cells prepared from WT and TLR9-KO mice. Indeed, the 5G5 anti-TLR9 mAb used in the present study recognizes both human and mouse TLR9 [14]. We gated on Ly-6G<sup>high</sup> cells (most of them are CD11b<sup>+</sup> cells and thus granulocytes) that are known to express intracellular TLR9. WT PMNs indeed express intracellular TLR9 whereas no expression was observed in TLR9-KO PMNs, as expected (Fig. 1E). Those results indicate that the signal measured at the surface of human PMNs corresponds to TLR9. More importantly, only the cells expressing TLR9 at the cell surface (namely PMNs, B lymphocytes, and monocytes) strongly bind the TLR9 ligand (FITC-CpG-ODN 2006) at the cell surface (Fig. 1B–D), whereas all the cell types were stained positively with that ligand upon fixation/permeabilization, suggesting that the CpG-ODN also binds to its intracellular receptor. This observation confirms the presence of TLR9 at the cell surface and the specific interaction with its ligand suggests that surface-expressed TLR9 is active. To determine whether PMNs express a mature form of TLR9 at the cell surface, human PMNs were isolated from fresh blood and analyzed by flow cytometry after staining with another TLR9-specific mAb (clone 26C593, Supporting Information Fig. 1),



**Figure 1.** Human primary PMNs express a processed TLR9 at the cell surface. PBMCs and PMNs were freshly isolated from the peripheral blood by dextran centrifugation and mixed (except in (F)). Cells were analyzed by multicolor flow cytometry using different gates. (A) Cells contained in gates R1 and R2 were characterized and the percentages of gated cells positive for the marker of interest are indicated. (B) Cells from gate R1, which are PMNs according to the staining for CD66b and CD11b (left), were stained for cell surface (without permeabilization) and intracellular (after permeabilization) TLR9 using an anti-TLR9-FITC mAb (5G5) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 antibody. Alternatively, cells were stained with a FITC-CpG-ODN (a TLR9 ligand). (C, D) Cells from gate R2 were stained for (C) CD3 and CD19 or (D) CD3 and CD56 and analyzed for surface and intracellular TLR9 expression or stained with the FITC-CpG-ODN as described in (B). (E) BM cells were isolated from WT and TLR9-KO mice and stained for Ly-6G and CD11b or the corresponding isotype control. Ly-6G-positive cells were then analyzed for intracellular TLR9 expression as in (B). (F) PMNs mainly express a cleaved form of TLR9 at the cell surface. Human PMNs and PBMCs were isolated separately and stained for cell surface and the intracellular N-terminal region of TLR9 (black histograms, N-terminal TLR9 staining). In PBMCs, PBLs were gated. Data are representative of ten independent experiments (except E, five experiments) using cells isolated from independent donors. Ab: antibody; CpG: FITC-CpG-ODN 2006. Filled gray histograms depict isotype controls. (B–D) Black histograms represent TLR9 staining; red histograms represent FITC-CpG-ODN staining.



**Figure 2.** Human primary PMNs express a cell surface TLR9 and bind to TLR9 ligands. PMNs were purified from fresh blood and analyzed by confocal microscopy in the absence of PBMCs. (A) PMNs were stained consecutively with anti-TLR9-FITC (5G5) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 (without permeabilization) at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB. The individual fluorescence channels and the merged signal are shown (right). The intensity of both signals (measured along the white bar) is also depicted. (B) PMNs were then incubated with FITC-CpG-ODN 2006 at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB and analyzed. The individual channels, the merged signal (arrows) and the intensity of both signals across the cells (white bar) are depicted. (A, B) The scale bar represents 10 μm. Data shown are representative of eight independent experiments performed. CpG, FITC-CpG-ODN 2006; AFU: arbitrary fluorescence units.

which recognizes the TLR9 moiety cleaved and removed during TLR9 processing and maturation. This N-terminal fragment should not be transported to the cell surface because it contains no transmembrane domain. Therefore, this mAb should not stain the processed TLR9 at the cell surface. We used from this point on highly purified PMNs, yielding only the cell population corresponding to gate R1 and PMNs were not mixed with PBMCs. In most cases, PMNs and PBLs were only weakly stained at the cell surface with this mAb specific for unprocessed TLR9 (Fig. 1F) and therefore only express low levels of full-length TLR9 at the cell surface. As a control, clone 26C593 recognized intracellular TLR9 in both cell types, especially in PBLs. Since PMNs (and PBLs) were stained with the 5G5 mAb at the cell surface (Fig. 1B), those results suggest that PMNs (and PBLs) mainly express a processed TLR9 at the cell surface.

To confirm the presence of TLR9 at the cell surface, highly purified human PMNs were analyzed by confocal microscopy. Cells were stained for TLR9 expression (green) at 4°C in the presence of cholera toxin subunit B (CTB, red) to stain the cell surface. As shown in Figure 2A, a TLR9-specific signal was observed at the cell surface of PMNs, as demonstrated by the merged signal with CTB staining. The histogram depicting the intensity of both signals (measured along the white bar) shows that both signals

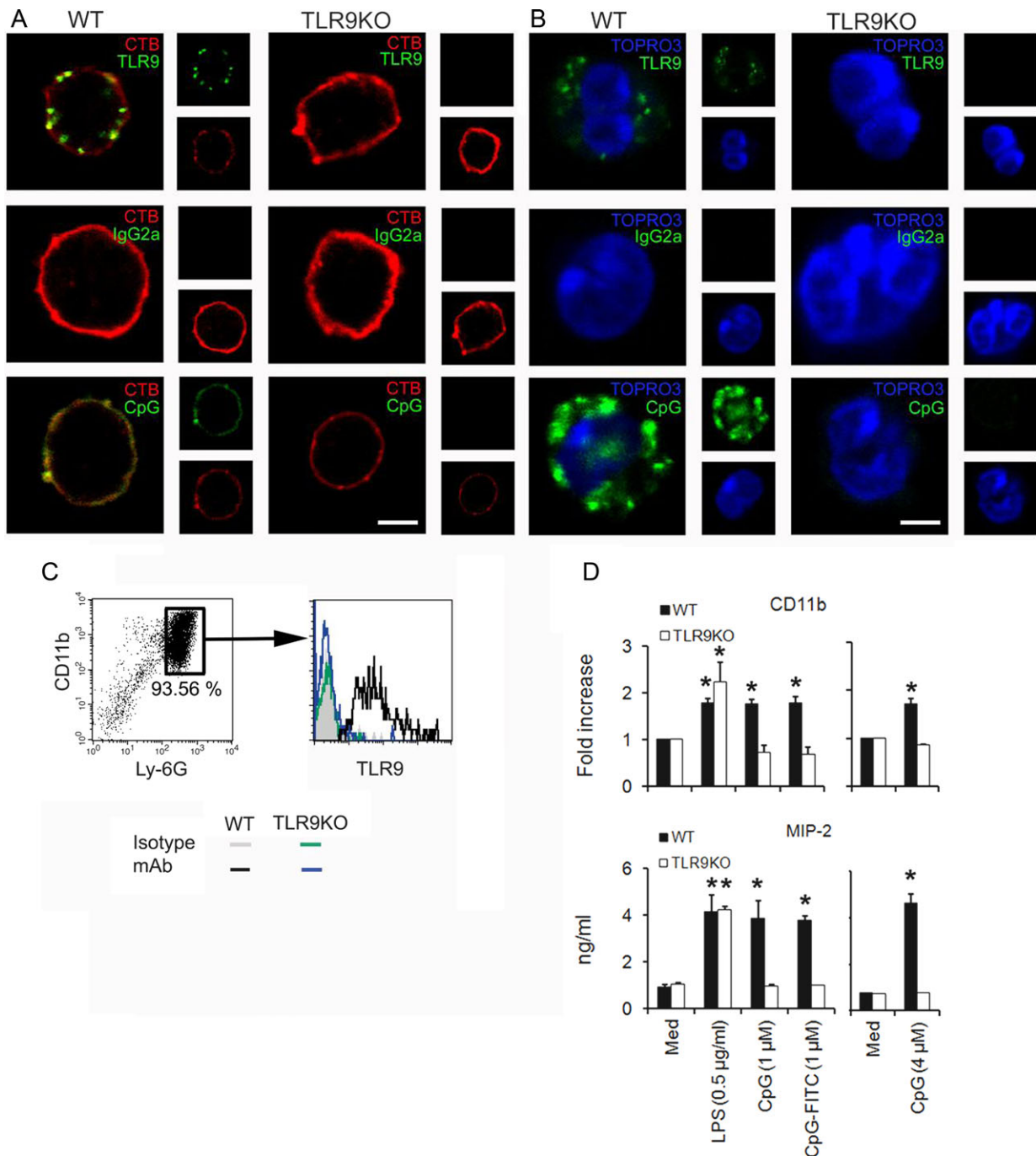
overlay along the cell membrane. PMNs were then incubated with FITC-CpG-ODN 2006 (green) in the presence of CTB and analyzed (Fig. 2B). The TLR9 ligand bound to the cell surface of PMNs (merged signal), in line with the cell-surface expression of TLR9. When analyzing both signals across the cells (white bar), we only detected the FITC-CpG-ODN at the cell surface, as depicted by the overlay in the histogram showing the intensity of both signals. The binding of the CpG-ODN at the cell surface suggests that TLR9 recognizes its ligand.

To support our observations, several control experiments were performed. We first analyzed unpurified PMNs in whole blood instead of isolated PMNs to show that the PMN isolation procedure used above does not influence TLR9 cell-surface expression. RBCs were lysed and fresh whole blood cells were directly stained at 4°C and analyzed by flow cytometry. Moreover, a different combination of antibodies was used to confirm the staining reproducibility and specificity. Gating on PMNs, we detected TLR9 at the cell surface (Supporting Information Fig. 2A). Then, to prove that the detected TLR9 is at the cell surface and not inside cells, freshly isolated PMNs were analyzed by flow cytometry (with the same antibody combination as was used in Fig. 1B) in the presence of Trypan blue (TB) that quenches the extracellular FITC fluorescence, whereas intracellular FITC fluorescence is not altered [31]. The PMNs used were highly pure (Supporting Information Fig. 2B) and uniformly expressed surface TLR9 (Supporting Information Fig. 2C). As a negative control, we analyzed the endocytosis of fluorescent molecules at 37°C using FITC nucleosomes as a marker (nucleosomes slightly bind to the PMN cell surface whereas they are strongly endocytosed by PMNs [32]). FITC nucleosomes were taken up by PMNs and the signal was not inhibited by TB (Supporting Information Fig. 2D). As expected, the staining of surface CD66b was decreased in the presence of TB, confirming its activity. In contrast to FITC-nucleosomes, the staining of surface TLR9 (and CD66b) at 4°C was decreased in the presence of TB (Supporting Information Fig. 2E). Those results indicate that TLR9 is indeed present at the cell surface of PMNs.

### Primary mouse PMNs also express TLR9 at the cell surface

To confirm the specificity of the TLR9 staining and to show that the CpG-ODN mainly binds to the cell surface TLR9 and not to an as-yet-unidentified DNA sensor as proposed [33], PMNs were isolated from WT and TLR9-KO mice by magnetic cell sorting. Mouse PMNs were stained in the presence of CTB and analyzed by confocal microscopy. WT PMNs showed a strong cell surface TLR9 signal upon staining with the 5G5 mAb, as demonstrated by the co-localization with the CTB signal, which was not detected upon staining with the corresponding isotype control (Fig. 3A). More importantly, the TLR9 staining was not observed with TLR9-KO PMNs, indicating that the cell-surface signal measured with WT PMNs was TLR9 specific. Likewise, the TLR9 ligand CpG-ODN strongly bound to the cell surface of WT PMNs, whereas no or low binding was detected with TLR9-KO PMNs, confirming that the





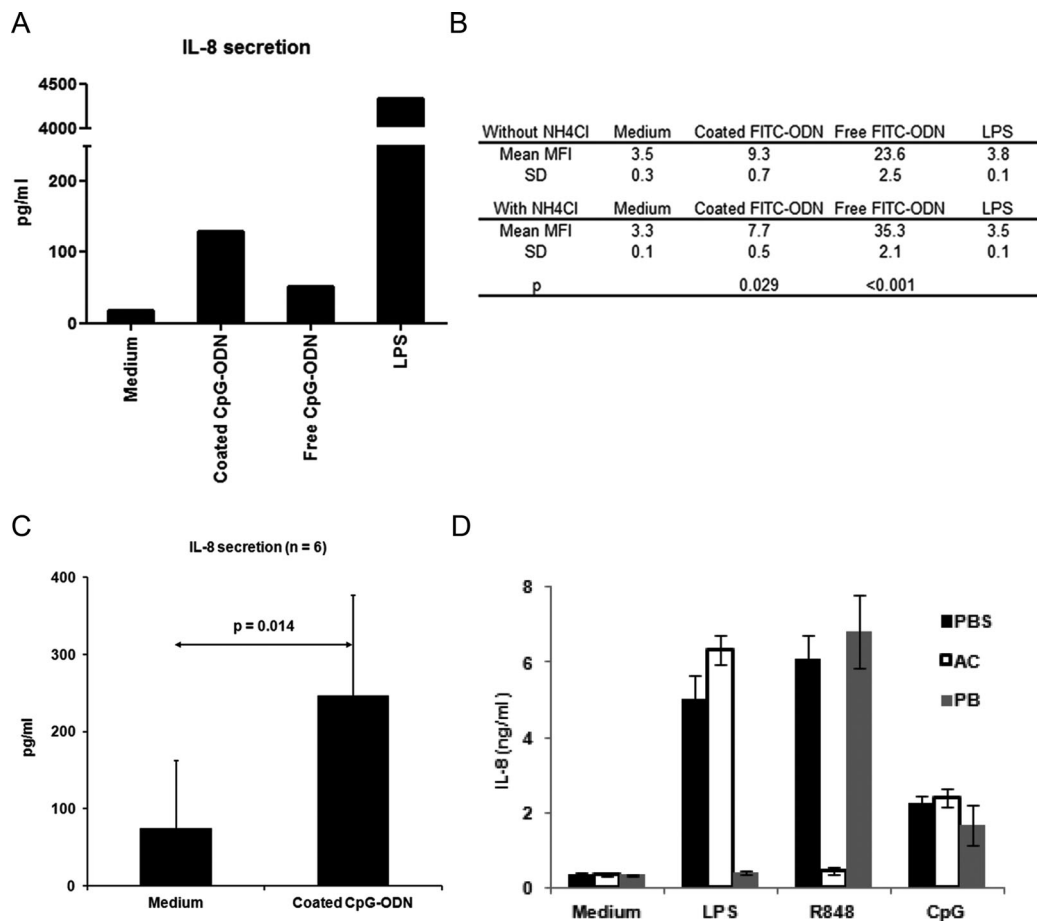
**Figure 3.** Mouse PMNs express also a cell surface TLR9 and the staining is specific. PMNs were purified from the BM of WT and TLR9-KO mice. (A) Cells were stained consecutively with anti-TLR9-FITC (5G5, upper panel) or the corresponding isotype control (middle panel) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 or were directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 (lower panel) at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB (without permeabilization). PMNs were then analyzed by confocal microscopy as described in Figure 2. CpG, FITC-CpG-ODN 2006. (B) The same staining was performed using permeabilized cells to detect intracellular TLR9 expression and CpG-FITC binding, except that PMNs were stained with TO-PRO-3 instead of CTB. (A, B) The scale bar represents 5 µm. The individual fluorescence channels and the merged signal are shown. (C) Purified PMNs isolated from WT and TLR9-KO mice were analyzed by flow cytometry. The phenotype of the isolated cells was verified by Ly-6G and CD11b staining. Nonpermeabilized Ly-6G-positive cells (all of them are CD11b-positive) were analyzed for cell surface TLR9 expression as described in Figure 1. (D) The mouse PMNs isolated in (C) were cultured with LPS, CpG-ODN 2006, FITC-CpG-ODN 2006, or CpG-ODN 1826 (right histograms) for 16 h. Cell activation was then estimated by measuring CD11b upregulation (flow cytometry, depicted as fold increase versus medium) and MIP-2 secretion (ELISA). Data are shown as mean + SD of five samples pooled from five independent experiments. \**p* < 0.05 versus medium, Student's *t*-test.

binding of the CpG-ODN to the cell surface of PMNs is essentially mediated by TLR9. The same experiment was then reproduced with fixed and permeabilized cells (Fig. 3B). Cells were stained with the DNA dye TO-PRO-3 instead of CTB in order to stain the nucleus. Only WT, but not TLR9-KO, PMNs showed a TLR9 signal, whereas no signal was observed upon staining with the isotype control, confirming that the mAb used was TLR9 specific and that the control mice used were TLR9-KO. Similarly, the CpG-ODN only bound to the intracellular TLR9 present in WT PMNs. The surface expression of TLR9 by those purified PMNs was confirmed by flow cytometry. Nonpermeabilized WT PMNs show a strong expression of surface TLR9, which was not observed with TLR9-deficient PMNs (Fig. 3C). To confirm that the FITC-CpG-ODN 2006 used is an active TLR9 agonist for mouse PMNs, cells were cultured with different stimuli and cell activation was estimated. Indeed, CpG-ODNs are often cell type specific and the conjugation to a FITC molecule may interfere with cell activation. WT PMNs were equally activated by CpG-ODN 2006 and FITC-CpG-ODN 2006, as shown by CD11b upregulation and MIP-2 secretion (Fig. 3D), whereas activation was not observed with TLR9-deficient PMNs. Similarly, only WT PMNs were activated by the mouse-optimized CpG-ODN 1826. As a control, WT and TLR9-deficient PMNs were activated by LPS, indicating that all the CpG-ODN used (conjugated to FITC or not) are TLR9 ligands and are not contaminated by endotoxins (which is an important control for the functional assay of surface TLR9 described under *TLR9 expressed at the cell surface of primary neutrophils is functional*). All those results confirmed the specificity of the TLR9 staining and the presence of TLR9 at the cell surface of PMNs. The strong binding of the CpG-ODN at the cell surface of WT but not TLR9-KO PMNs indicates that TLR9 expressed at the cell surface is able to recognize its ligand.

### TLR9 expressed at the cell surface of primary neutrophils is functional

The results described above clearly show that the TLR9 ligand binds to the cell surface of primary PMNs and that the binding is specifically mediated by TLR9. It therefore indicates that this receptor is at least partially functional since it recognizes this ligand. We then analyzed whether ligation of FITC-CpG-ODN 2006 to the cell surface TLR9 triggers activation of primary human PMNs. In order to specifically stimulate TLR9 at the cell surface, the FITC-CpG-ODN 2006 was cross-linked by UV irradiation onto a nitrocellulose cell culture plate. The technical approach used is shown in Supporting Information Fig. 3A. The efficacy was verified by measuring the FITC fluorescence at all the different steps using a fluorometer (Supporting Information Fig. 3B, upper part). The results show that the ODN was covalently bound to the wells. Nevertheless, only  $25.6 \pm 9.8\%$  of the incubated ODN was efficiently immobilized onto the plate. Freshly isolated PMNs were then cultured in the CpG-ODN-coated plate. As negative and positive controls, PMNs were cultured in medium alone or supplemented with LPS, respectively. As a comparison, PMNs were

cultured with the FITC-CpG-ODN 2006 free in solution at a sub-optimal concentration (adjusted to the amount of the cross-linked ODN). The concentration of the free ODN used was either the same than that of the cross-linked ODN (as estimated by measuring the FITC fluorescence) or slightly higher. Indeed, UV irradiation did not allow the cross-linking of an optimal amount of ODN. After overnight culture, the cross-linked ODN was still detectable in the cell culture whereas only a slight signal was detected for that ODN in the supernatants (Supporting Information Fig. 3B, lower part), suggesting that only a minute amount of the ODN is released and that most of it is still nitrocellulose bound. A stronger signal was detected for the free (not cross-linked) ODN in both the culture and supernatants, indicating that the latter was essentially in solution and not immobilized. Importantly, the cross-linked ODN induced the activation of PMNs, as shown by the IL-8 (CXCL8) secretion (Fig. 4A), indicating that the cell surface TLR9 is functional. The activation was even stronger than the activation measured with the same ODN in solution, whereas the latter was used at a stronger concentration. After cell culture, the FITC fluorescence was also measured in PMNs by flow cytometry. As expected, a strong signal was detected in PMNs incubated with the free FITC-ODN (Fig. 4B and Supporting Information Fig. 3C, left panel). Surprisingly, PMNs incubated with the cross-linked ODN showed an intermediate signal, suggesting that PMNs are able to detach part of the FITC molecules or part of the cross-linked ODN from the nitrocellulose filter. To determine whether the signal corresponds to a cell-surface signal only, the same cells were measured in the presence of ammonium chloride (AC), an inhibitor of endosomal acidification. The FITC fluorescence is indeed inhibited at low pH values and AC protects and restores the endosomal FITC fluorescence [31]. As shown in Figure 4B and Supporting Information Figure 3C (right panel), whereas the FITC fluorescence of the free ODN was significantly increased in the presence of AC ( $p < 0.001$ ), the fluorescence of the cross-linked ODN was slightly but significantly decreased ( $p = 0.029$ ), indicating that the ODN has different properties upon immobilization. Compared to the expected behavior of the free ODN that reaches endosomes, the results confirm that the cross-linked ODN bound only to the PMN surface (i.e. is cell bound but remains external) and did not reach the endosomal TLR9. The activation observed with the cross-linked ODN is therefore triggered by the cell surface TLR9. Primary PMNs were then isolated from six independent healthy donors and cell activation by the cross-linked ODN was determined in six independent experiments. The coated ODN induced a significant IL-8 secretion ( $p = 0.014$ ), showing clearly that the TLR9 expressed at the cell surface of PMNs recognized its ligand and is functional (Fig. 4C). To support this hypothesis, PMN activation was estimated in the presence/absence of the lysosomotropic agent AC or the LPS inhibitor polymyxin B (PB). Free CpG-ODN activated PMNs independently of endosomal acidification whereas activation with Resiquimod (R848), a TLR7/8 ligand in humans, was abolished in the presence of AC (Fig. 4D), indicating that TLR9 can signal from the cell surface. As a control, activation with the TLR4 ligand LPS but not with free CpG-ODN was inhibited by PB, excluding that the noninhibition of free CpG-ODN by AC is



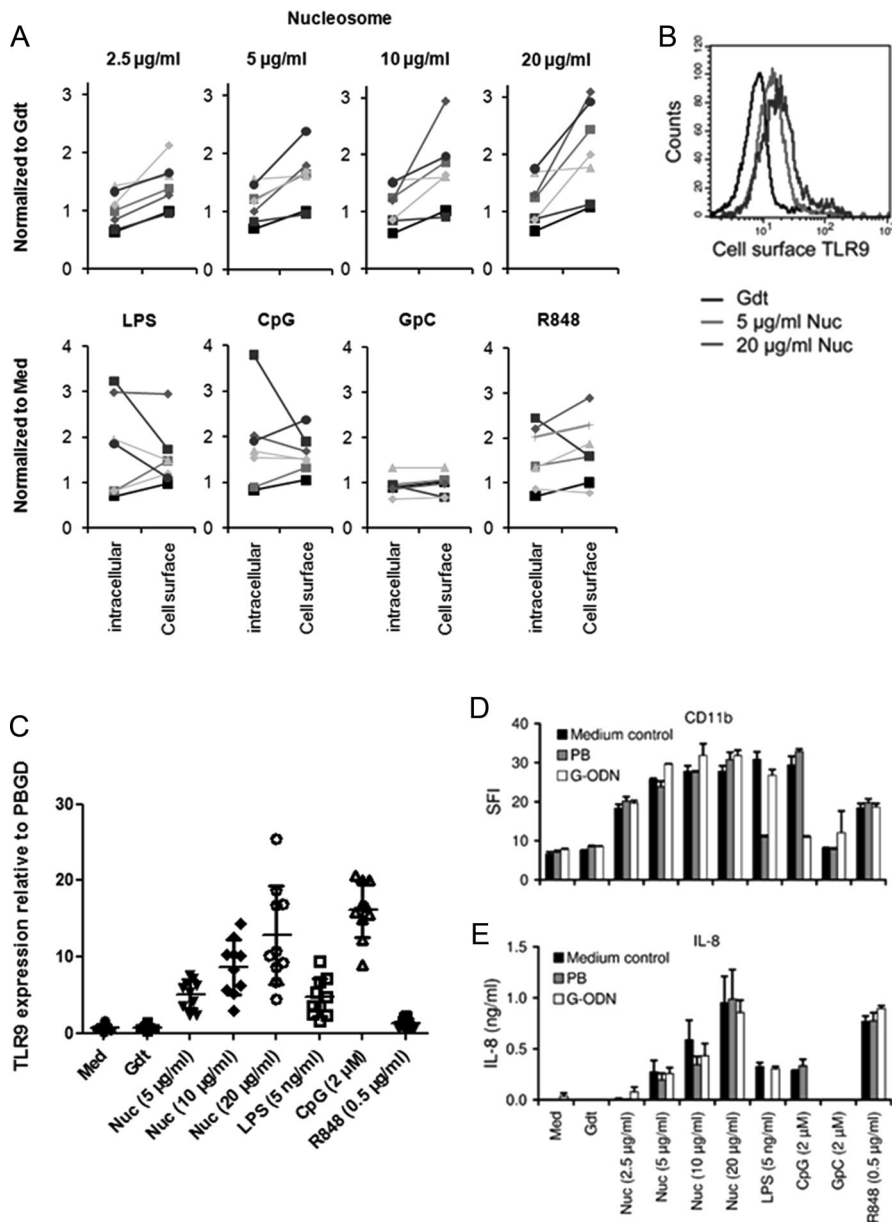
**Figure 4.** Human primary PMNs express a functional cell surface TLR9. (A–C) UV-treated nitrocellulose plates were incubated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS and the efficiency of the ODN cross-linking was verified by measuring the FITC fluorescence using a fluorometer. Human PMNs were isolated from healthy individuals and cultured in the cross-linked plate for 16 h. As a control, cells were activated with free (noncross-linked) FITC-CpG-ODN 2006 or LPS (5 ng/mL). The actual concentrations were 0.48 and 1  $\mu$ M for the cross-linked and the free ODN, respectively. (A) The level of PMN activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. (B) Cultured PMNs were also analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the absence or presence of ammonium chloride (AC, NH<sub>4</sub>Cl). The impact of AC on the FITC fluorescence was estimated by a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test on the MFI measured (mean  $\pm$  SD of triplicates). (A, B) One representative experiment of three experiments performed is shown. (C) PMNs were isolated from healthy individuals and the capacity of the cross-linked ODN to trigger surface TLR9-mediated cell activation was tested. IL-8 secretion was determined by ELISA. The cumulative results (normalized to the actual concentration of the cross-linked ODN measured with the fluorometer) are shown as mean  $\pm$  SD. Data are from six experiments performed in triplicates. Statistical significance measured by a Student's *t*-test. (D) Isolated PMNs were cultured in medium supplemented with PBS, AC, or PB. Cells were stimulated or not with 7.5 ng/mL LPS, 0.3  $\mu$ g/mL R848, or 2  $\mu$ M free CpG-ODN, and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are shown as mean  $\pm$  SD of one experiment representative of six performed in triplicates.

due to the presence of endotoxins. Similar results were obtained in the presence of bafilomycin A1 (Supporting Information Fig. S4). Bafilomycin A1 is, however, able to inhibit TLR9 signaling in PBMC (Supporting Information Fig. 5).

### TLR9 surface expression is upregulated in response to PMN stimulation

We next investigated whether the expression of the cell surface TLR9 is modulated upon PMN activation. Cells from healthy individuals were incubated with different TLR ligands or purified nucleosomes, an autoantigen that activates PMNs in a TLR9-independent manner [32]. Interestingly, CpG-ODN-mediated PMN activation led to an upregulation of the cell surface TLR9 in part of the donors (Fig. 5A). No significant effect was observed in

response to the control GpC-ODN (ODN with GpC motifs instead of CpG). Activation with R848 or LPS also led to surface TLR9 upregulation in some donors. Importantly, nucleosome-induced PMN activation was associated with a concentration-dependent upregulation of the cell surface TLR9 in most of the donors (Fig. 5A and B). In most cases, surface TLR9 upregulation was associated with an upregulation of the intracellular TLR9 (Supporting Information Fig. 6), with LPS being a potent inducer of endosomal TLR9 expression and nucleosomes potent inducers of surface TLR9 expression. Modulation of TLR9 expression is therefore not restricted to TLR9 ligands. Priming of PMNs with GM-CSF was not efficient in upregulating cell surface TLR9, although it enhanced PMN activation by free CpG-ODN and upregulated intracellular TLR9 (Supporting Information Fig. 7). Activation-induced upregulation of TLR9 expression was



**Figure 5.** Surface TLR9 is upregulated in human PMNs upon cell activation. PMNs were isolated from seven independent healthy donors and cultured with different concentrations of nucleosomes, LPS (5 ng/mL), CpG-ODN (2 µM), GpC-ODN (2 µM), or R848 (0.5 µg/mL). (A) After 16 h, cells were stained for surface and intracellular TLR9 (clone 5G5) and analyzed by flow cytometry as described in Figure 1. The fluorescence was normalized to that of the gradient or medium controls in order to visualize the modulation (fold increase) of TLR9 expression induced by either nucleosomes or the TLR ligands, respectively. Shown are all the donors tested; each line represents a donor. (B) A typical flow cytometry histogram showing the nucleosome-induced upregulation of cell surface TLR9 in human PMNs is depicted. Cell surface TLR9 expression was measured in untreated PMNs (Gdt) and PMNs stimulated with nucleosomes (Nuc). (C) TLR9 expression was analyzed in PMNs at the mRNA level by quantitative RT-PCR. PMNs were untreated or stimulated and the activation-induced TLR9 upregulation was determined. TLR9 mRNA levels were normalized to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were compared using a Student's *t*-test. The results show ten independent healthy donors (each dot represents one donor) with mean ± SD (depicted as fold increase). PMN activation was verified by measuring the CD11b upregulation by (D) flow cytometry and (E) IL-8 secretion by ELISA. Data are shown as mean + SD of triplicates from one donor of the seven donors tested in (A). Data are representative of seven independent experiments. PB: polymyxin B; G-ODN: TLR9 antagonist; Med: medium; Gdt: nucleosome purification buffer; Nuc: nucleosomes.

confirmed in PMNs at the mRNA level by quantitative RT-PCR (Fig. 5C). TLR9 mRNA were strongly increased by nucleosomes in a dose-dependent manner (16.7-fold increase at 20 µg/mL;  $p < 0.0001$  versus the purification buffer (Gdt) and by the cognate TLR9 agonist (CpG-ODN, 20.9-fold increase;  $p < 0.0001$  versus medium). LPS also led to a significant increase of TLR9 mRNA levels (6.05-fold increase;  $p = 0.0001$  versus medium), whereas R848 surprisingly induced a lower but still significant increase (1.72-fold increase;  $p = 0.026$  versus medium). PMN activation was verified by measuring the CD11b upregulation (Fig. 5D) and IL-8 secretion (Fig. 5E). Nucleosomes trigger a concentration-dependent PMN activation that was not inhibited by PB or the TLR9 antagonist ODN containing a G5 motif (G-ODN). As a control, LPS and CpG induced PMN activation but were inhibited by PB or G-ODN, respectively, whereas GpC-ODN did not activate. Therefore, the

nucleosome-mediated PMN activation and the surface TLR9 upregulation occurred independently of TLR9 triggering and are not influenced by endotoxins. R848 activated PMNs and was not inhibited by PB or G-ODN. Thus, all the potential stimuli led to PMN activation, indicating that the modulation of endosomal/cell surface TLR9 expression is correlated with cell activation.

## Discussion

We have shown for the first time that primary human and mouse PMNs express TLR9 at the cell surface. This is also the first demonstration that an ectodomain-cleaved functional TLR9 is expressed at the cell surface of human primary cells. Previous studies have already reported that monocytes and B lymphocytes

express a cell surface TLR9 [24–27, 29] but PMNs have not been described. Moreover, the functionality and the processing of the cell surface TLR9 have not been addressed so far. Although activation by the cross-linked ODN was relatively low, IL-8 secretion was significantly increased. It therefore suggests that the surface-expressed TLR9 is less functionally efficient than the endosomal TLR9. Nevertheless, other causes, essentially technical reasons, may explain the apparent low activity of the surface TLR9 using this approach. For example, we observed that the nitrocellulose plates used are not optimal for PMN activation. Thus, when PMNs were cultured with CpG-ODN 2006 in solution in standard cell culture plates and nitrocellulose plates in parallel, cell activation was much stronger in standard plates (our unpublished observations). Moreover, UV irradiation only allowed the cross-linking of low amounts of CpG-ODN ( $0.51 \pm 0.20 \mu\text{M}$ , final concentration), whereas we found that  $2 \mu\text{M}$  of the same ODN is required for optimal PMN activation in standard plates. By measuring the FITC fluorescence at all steps of the cross-linking procedure, we have clearly shown that the cross-linked ODN did not reach endosomal TLR9. Activation could therefore only be achieved through the triggering of surface TLR9. The flow cytometric analysis of the FITC fluorescence confirmed that the free CpG-ODN reached the endosome, as evidenced by the increased signal intensity in the presence of AC. On the contrary, a decrease in signal intensity was observed with the cross-linked ODN in the presence of AC, indicating that this ODN only bound to the cell surface and was not taken up by PMNs. Altogether, we have confirmed that the CpG-ODN used in the present study triggers only TLR9 and that this cross-linked ODN is cell bound. Therefore, the signal triggered at the cell surface of human PMNs by the cross-linked ODN is TLR9 mediated. Most importantly, to support our conclusions and to discriminate between TLR9 located at the plasma membrane from TLR9 located in the endosomes, we have shown that CpG-ODN-mediated PMN activation is not inhibited by AC or baifomycin A1, demonstrating that TLR9 can also signal from the cell surface. Finally, we observed that intracellular TLR9 and cell surface TLR9 are upregulated in most donors upon activation. TLR9 upregulation occurred not only in PMNs activated with CpG-ODN but also in the presence of LPS, R848, or nucleosomes, as reported previously, and is therefore TLR9 independent and even not TLR restricted.

In conclusion, PMNs express a functional cell surface TLR9 that is upregulated upon PMN activation. Therefore, CpG-ODNs do not need to be accumulated in subcellular compartments for TLR9 binding and signaling in PMNs. Our results might partly explain why CpG-ODNs are still able to activate immune cells in the absence of granulins (although at a lower extent) as granulins has been described to particularly potentiate the delivery of CpG-ODNs to endosomal TLR9 [22]. We suggest that surface TLR9 expression works as a rescue mechanism for PMN activation when pathogen-derived TLR9 ligands have no access to endosomal TLR9 or when intracellular TLR9 is resistant to activation. Alternatively, surface TLR9 may also be involved in the transport of extracellular TLR9 ligands to endosomes. Finally, the cell surface TLR9 may recognize ligands that normally do not activate intracellular

TLR9 as previously reported for transfected cell lines [21]. TLR9 carrying mutations in the transmembrane region can access the cell surface and responds to extracellular DNA, which leads to fatal inflammation *in vivo* [34]. Particularly, cell surface TLR9 might be involved in the typical immune response to self-DNA that characterizes some inflammatory autoimmune diseases [35], especially systemic lupus erythematosus, particularly if self-DNA is able to upregulate cell surface TLR9. This is indeed the situation we mimicked in the present work with purified nucleosomes. Recently, impaired trafficking of TLR9 and TLR7 was shown to provoke systemic lethal inflammation [36]. Increased cell-surface expression of TLR9 may be a pro-inflammatory activation marker during infectious or autoimmune diseases. Thus, identification of TLR9 cell-surface expression in PMNs is critical for our further understanding of the triggering and the regulation of inflammation, and might lead to the discovery of so far unknown TLR9 ligands specific for the cell-surface receptor. Our results also contribute in delineating the mechanisms involved in the recognition of DNA. Nevertheless, future studies will be required to determine whether the intracellular and cell surface TLR9 are encoded by the same gene, whether they represent isoforms or whether the endosomal TLR9 may be translocated to the cell surface.

## Materials and methods

### Mice

TLR9-deficient mice [8] on a C57BL/6 genetic background were obtained from Professor H. Wagner (Munich, Germany). WT C57BL/6 control mice were purchased from Charles River. Experiments were approved by the local animal ethics committee (Regierungspräsidium Tübingen, § 4 Abs. 3 and the Darwin Committee of the University of Paris 13).

### Human samples

Heparin or EDTA blood from random, healthy individuals was used. Human experiments were approved by the local ethics committee (reference 386/2006V). Alternatively, blood samples were obtained from the blood bank of Bobigny.

### Nucleosome purification

Mononucleosomes (major lupus autoantigens known to induce PMN activation [37]) were purified by ultracentrifugation onto sucrose gradients as described previously [38]. As a control, an empty gradient (not loaded with chromatin) was prepared. The preparations contain low endotoxin levels (10–50 IU/mg nucleosomes) as determined using a Limulus Amebocyte Lysate assay (BioWhittaker). A similar concentration (in IU/mL) was measured in purified nucleosomes and in the purification buffer (empty gradient) that was used as a negative control. Nucleosome

preparations were always first tested using PMNs cultured with and without the LPS inhibitor PB (Fluka). For endocytosis assays, nucleosomes were dialyzed against PBS and conjugated to FITC as previously described [39].

### Cell isolation, culture, and activation

Human PBMCs and PMNs were freshly isolated from peripheral blood by dextran density centrifugation [37]. Contaminating RBCs were lysed using a hypotonic buffer. Mouse neutrophils were isolated from BM cells obtained from adult WT and TLR9-KO mice (sex and age matched, 8–12 weeks old). Neutrophils were enriched by positive selection for Ly-6G<sup>+</sup> cells using magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Contaminating RBC were lysed. Human (defined as CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD66b<sup>+</sup> cells, purity >90% of living cells) and mouse PMNs (defined as F4/80<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, B220<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>high</sup> cells, purity >90%) were cultured in RPMI 1640 medium (BioWhittaker), supplemented with 10% FCS (PAA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (both from Gibco), and 50 µM 2-ME (Roth). For cell activation studies, human and mouse PMNs were plated into 96-well plates at a density of 1 or 1.5 × 10<sup>6</sup> cells/mL, respectively. G-CSF (50 ng/mL, ImmunoTools) was added to mouse PMNs. Cells were either incubated in medium alone or activated with purified nucleosomes, the purification buffer as negative control (empty gradient (Gdt)), R848 (Alexis), LPS (from *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli*, Sigma), CpG-ODN 2006 (5'-tcgctgttttgcgtttgtcgtt-3', Metabion or Invivogen) and 1826 (5'-tccatgacgttctgacgtt-3', Metabion), GpC-ODN 2006 (Metabion), and FITC-CpG-ODN 2006 (Invivogen). All ODNs were phosphorothioate. Experiments were conducted in the presence/absence of PB (6.25–25 µg/mL), AC (2 mM, Roth), or a TLR9 antagonist (G-ODN, 4 µM, Metabion). After 16 h, cell culture supernatants were harvested and cells were analyzed by flow cytometry.

### Antibodies and flow cytometry

All antibodies were purchased from BD Biosciences, if not stated otherwise. The antibodies used are described in Supporting Information. Human PMNs and PMBCs were first incubated with PBS/5% heat-inactivated human serum, whereas PBS/2% heat-inactivated autologous mouse serum was used for mouse PMNs. After washing, cells were incubated with the indicated mAbs or the corresponding isotype controls in PBS/serum/0.01% sodium azide to reduce the unspecific uptake of mAbs. For surface TLR9 staining, cells were incubated with FITC-CpG-ODN 2006 or with anti-TLR9-FITC (5G5 mAb) or anti-N-terminal region of TLR9 (26C593 mAb) or the corresponding isotype controls and then with anti-FITC-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) or GAM-PE. For intracellular staining, cells were first stained for surface markers, permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), and incubated with anti-TLR9-FITC or anti-N-terminal region of TLR9 (or the corresponding isotype controls), washed and then with anti-FITC-Alexa Fluor

488 or GAM-PE or directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 in PBS/0.1% saponin (Sigma). All incubations were carried out at 4°C for 30 min. Cells were finally fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed on a four-color FACSCalibur apparatus (Becton Dickinson). Data were evaluated with CELLQuest software (Becton Dickinson).

In some cases, PMNs were stained, incubated in the presence/absence of 0.1% TB and immediately analyzed by flow cytometry to determine whether the signal detected is an intracellular or a cell-surface staining. To confirm the inhibition of extracellular fluorescence, cells were stained with the anti-CD66b-FITC mAb. As a control, to analyze nucleosome endocytosis (not inhibited by TB) PMNs were incubated with or without 10 µM FITC-nucleosomes at 37°C in 10% FCS-containing PBS for 30 min.

### Confocal microscopy

To demonstrate the cell-surface expression of TLR9, PMNs were incubated with FITC-CpG-ODN 2006 or were consecutively incubated with anti-TLR9-FITC (or the corresponding isotype control) followed by anti-FITC-Alexa Fluor 488 in PBS/serum/0.01% sodium azide (30 min, 4°C for all steps). To stain the cell surface, cells were incubated with Alexa Fluor 555-conjugated CTB (20 µg/mL, Molecular Probes) and fixed. For intracellular TLR9 staining, cells were permeabilized and incubated with anti-TLR9-FITC (or the corresponding isotype control) and then with anti-FITC-Alexa Fluor 488 or directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 in PBS/0.1% saponin. To stain the nucleus, cells were then incubated with TO-PRO-3 (1/1,000, Molecular Probes). Finally, cells were mounted on Lab-Tek Chambered 1.0 borosilicate coverglass systems (Nunc) and kept in the dark at 4°C. Confocal microscopy was conducted using an inverted LSM510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss) fitted with a Plan-Apochromat 63×/1.4 OIL DIC objective, and the pinhole was set to scan layers of 1 µm. FITC and Alexa 488 were excited at 488 nm with an argon-ion laser. Alexa 555 and TO-PRO-3 were excited at 543 and 633 nm, respectively, with helium–neon lasers. Images were acquired by single-track measurement and scales are indicated.

### ELISA

Detection of IL-8 and MIP-2 secretion by human and mouse PMNs was analyzed by sandwich ELISA using OptEIA set or mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences or R&D Systems, respectively, and according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations in cell culture supernatants are depicted as mean ± standard deviation of triplicates.

### Cell surface TLR9 functional assay

Nitrocellulose plates (Millipore, MSHA S4510) were activated by UV irradiation at 254 nm (UV Stratalinker 1800, Stratagene,

20 J/cm<sup>2</sup>) and coated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS (1.5–2.5 μM) for 4 h at room temperature. The presence of the FITC-CpG-ODN 2006 was confirmed by measuring the FITC fluorescence using a SPECTRA Fluor fluorometer (TECAN). Plates were then washed three times with PBS and the last wash was measured with the fluorometer to confirm the absence or free (unbound) FITC-CpG-ODN. The plate was filled with PBS and the FITC fluorescence was measured in order to estimate the CpG-ODN binding efficiency. Plates were then emptied and used for cell culture using human PMNs (1.5 × 10<sup>6</sup> cells/mL). LPS and free FITC-CpG-ODN 2006 were used as controls. After 16 h, the FITC fluorescence in the plate was measured. Cell culture supernatants were then transferred, the FITC fluorescence was measured and the IL-8 secretion was estimated by ELISA. Simultaneously, PMNs were harvested and analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the presence/absence of AC (10 mM).

### cDNA synthesis and quantitative RT-PCR analysis

For quantitative PCR analysis of TLR9 mRNA levels, total RNA was isolated from 2 × 10<sup>6</sup> PMNs with Trizol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. RNA template was treated with DNase I (amplification grade) and reverse-transcribed into cDNA by using Superscript II Reverse Transcriptase (both from Invitrogen). Prior to PCR, the resulting cDNA samples were treated for 30 min at 37°C with four units of RNase H (Ambion). The quantity and quality of the isolated RNA were established by UV spectroscopy and by the ability of the sample to be linearly amplified in a serial dilution with the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase. mRNA levels were determined with a PRISM 7000 sequence detection system with SYBR Green (both from Applied Biosystems) as the fluorophore and the following oligonucleotide primers (SA Biosciences): 5'-tgaagacttcaggccaactg-3' (forward), 5'-tgcacggtcaccaggtgt-3' (reverse). Quantitative PCR data were analyzed with 7000 Systems SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems) and checked for correct amplification and dissociation of the products. TLR9 mRNA levels were normalized to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were calculated according to the cycle threshold method.

### Statistical analysis

The mean FITC fluorescences measured by flow cytometry in the presence/absence of AC were compared using a Student's *t*-test or a Mann–Whitney rank sum test. The mean IL-8 concentrations induced in PMNs by either the medium alone or the coated CpG-ODN were compared using a Student's *t*-test after normalization of the different experiments to the actual concentration of the coated CpG-ODN. CD11b expression and MIP-2 secretion by mouse PMNs were compared using a Student's *t*-test. The TLR9 mRNA levels in untreated and activated PMNs were compared using a Student's

*t*-test. The SigmaStat software was used and a *p* value < 0.05 was considered significant.

**Acknowledgements:** We thank Prof. H. Wagner (Munich, Germany) and Dr. L. Grosse-Hovest (Tübingen, Germany) for the gift of TLR9-deficient mice and aliquots of anti-TLR9 mAb, respectively, and F. Poirier (University of Paris 13, Bobigny, France) for technical advice. This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG, DE 879/1-1 and 879/1-2), the University of Tübingen (IZKF-Nachwuchsgruppe, 1604-0-0 and 1604-0-1) and the Fritz-Thyssen Foundation to Dr. Patrice Decker and by the University of Paris 13 as well as Inserm. Part of the research of Dr. Dennis Lindau was performed within the framework of project D1-101 of Top Institute Pharma. I.J. received a fellowship from the German Research Foundation (Graduiertenkolleg 794). B.J.W. was supported by a fellowship from the fortune-program of the University of Tübingen (1793-0-1).

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

### References

- Nathan, C., Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. 6: 173–182.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L. et al., Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010. 115: 335–343.
- Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M. et al., Netting neutrophils are major inducers of type 1 IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011. 3: 73ra20.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S. et al., Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011. 3: 73ra19.
- Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H. and Yoshimura, T., Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 2001. 69: 698–704.
- Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. and Denkers, E. Y., Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 2003. 171: 6052–6058.
- van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. and van Kooyk, Y., Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 2005. 201: 1281–1292.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M. et al., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000. 408: 740–745.

- 9 Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S. et al., Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 2005. 174: 6129–6136.
- 10 Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T. and Nagata, S., Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.* 2005. 202: 1333–1339.
- 11 Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Lippa, P. B., Schmitz, F., Haas, T. et al., CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of “natural” phosphodiester DNA. *Eur. J. Immunol.* 2006. 36: 431–436.
- 12 Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E. and Wagner, H., The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines Toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008. 28: 315–323.
- 13 Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E. et al., TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 2004. 5: 190–198.
- 14 Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H., Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 2002. 32: 1958–1968.
- 15 Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G. B., Wagner, H. and Bauer, S., Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 2004. 34: 2541–2550.
- 16 Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G. P., Chapman, H. A. and Barton, G. M., The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 2008. 456: 658–662.
- 17 Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y. M. and Ploegh, H. L., Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* 2008. 9: 1407–1414.
- 18 Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K. et al., CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998. 17: 6230–6240.
- 19 Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E. and Ploegh, H. L., UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008. 452: 234–238.
- 20 Brinkmann, M. M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H. L. and Kim, Y. M., The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 2007. 177: 265–275.
- 21 Barton, G. M., Kagan, J. C. and Medzhitov, R., Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 2006. 7: 49–56.
- 22 Park, B., Buti, L., Lee, S., Matsuwaki, T., Spooner, E., Brinkmann, M. M., Nishihara, M. et al., Granulin is a soluble cofactor for Toll-like receptor 9 signaling. *Immunity* 2011. 34: 505–513.
- 23 Hayashi, F., Means, T. K. and Luster, A. D., Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003. 102: 2660–2669.
- 24 Dasari, P., Nicholson, I. C., Hodge, G., Dandie, G. W. and Zola, H., Expression of Toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol.* 2005. 236: 140–145.
- 25 Baiyee, E. E., Flohe, S., Lendemans, S., Bauer, S., Mueller, N., Kreuzfelder, E. and Grosse-Wilde, H., Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* 2006. 145: 456–462.
- 26 Cunningham-Rundles, C., Radigan, L., Knight, A. K., Zhang, L., Bauer, L. and Nakazawa, A., TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *J. Immunol.* 2006. 176: 1978–1987.
- 27 Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Chavarin, P., Pozzetto, B., Richard, Y. and Garraud, O., Identification of two subpopulations of purified human blood B cells. *Immunology* 2008. 125: 430–437.
- 28 Eaton-Bassiri, A., Dillon, S. B., Cunningham, M., Rycyzyn, M. A., Mills, J., Sarisky, R. T. and Mbow, M. L., Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 2004. 72: 7202–7211.
- 29 Saikh, K. U., Kissner, T. L., Sultana, A., Ruthel, G. and Ulrich, R. G., Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J. Immunol.* 2004. 173: 7426–7434.
- 30 Lee, J., Mo, J. H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y. T., Lee, H. K. et al., Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 2006. 8: 1327–1336.
- 31 Van Strijp, J. A., Van Kessel, K. P., van der Tol, M. E. and Verhoef, J., Complement-mediated phagocytosis of herpes simplex virus by granulocytes. Binding or ingestion. *J. Clin. Invest.* 1989. 84: 107–112.
- 32 Lindau, D., Rönnefarth, V., Erbacher, A., Rammensee, H. G. and Decker, P., Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 2011. 41: 669–681.
- 33 Fuxman Bass, J. I., Gabelloni, M. L., Alvarez, M. E., Vermeulen, M. E., Russo, D. M., Zorreguieta, A., Geffner, J. R. et al., Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface. *Lab. Invest.* 2008. 88: 926–937.
- 34 Mouchess, M. L., Arpaia, N., Souza, G., Barbalat, R., Ewald, S. E., Lau, L. and Barton, G. M., Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* 2011. 35: 721–732.
- 35 Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A., Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 2003. 19: 837–847.
- 36 Fukui, R., Saitoh, S., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M. et al., Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 2011. 35: 69–81.
- 37 Rönnefarth, V. M., Erbacher, A. I. M., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Nordheim, A., Rammensee, H. G. and Decker, P., TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2006. 177: 7740–7749.
- 38 Decker, P., Le Moal, A., Briand, J. P. and Muller, S., Identification of a minimal T cell epitope recognized by antinucleosome Th cells in the C-terminal region of histone H4. *J. Immunol.* 2000. 165: 654–662.
- 39 Decker, P., Wolburg, H. and Rammensee, H. G., Nucleosomes induce lymphocyte necrosis. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 1978–1987.



**Abbreviations:** **AC:** ammonium chloride · **CpG-ODN:** ODNs containing CpG motifs · **CTB:** cholera toxin subunit B · **G-ODN:** ODN containing a G5 motif (TLR9 antagonist) · **GpC-ODN:** ODN with GpC motifs instead of CpG · **ODNs:** oligonucleotides · **PB:** polymyxin B · **PMNs:** polymorphonuclear cells · **TB:** Trypan blue

**Full correspondence:** Dr. Patrice Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, Li2P, 74 Rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France  
Fax: +33-1-48-38-88-93  
e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

See accompanying Commentary:  
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201343882>

**Current address:** Dr. Dennis Lindau, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Department of Tumor Immunology, Radboud University, 6525 GA Nijmegen, The Netherlands

**Current address:** Dr. Viktoria M. Rönnefarth, Hain Lifescience GmbH, 72147 Nehren, Germany

**Current address:** Dr. Ivan Jelcic, Department of Neurology, University Hospital, Zurich, Switzerland

Received: 30/9/2011

Revised: 29/3/2013

Accepted: 14/5/2013

Accepted article online: 18/5/2013



## BIBLIOGRAPHIE

1. Ichii, M., K. Oritani, and Y. Kanakura, *Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse*. World J Stem Cells, 2014. **6**(4): p. 421-31.
2. Kondo, M., *Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 37-46.
3. Wasnik, S., et al., *Osteohematopoietic stem cell niches in bone marrow*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 95-133.
4. Blom, B. and H. Spits, *Development of human lymphoid cells*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 287-320.
5. Kurosaki, T., H. Shinohara, and Y. Baba, *B cell signaling and fate decision*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 21-55.
6. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
7. Martensson, I.L., et al., *The pre-B cell receptor checkpoint*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2572-9.
8. Eryilmaz, E., et al., *Global structures of IgG isotypes expressing identical variable regions*. Mol Immunol, 2013. **56**(4): p. 588-98.
9. Monroe, J.G., *ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 283-94.
10. Burger, J.A. and N. Chiorazzi, *B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Trends Immunol, 2013. **34**(12): p. 592-601.
11. Herzog, S., M. Reth, and H. Jumaa, *Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 195-205.
12. Schatz, D.G. and Y. Ji, *Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 251-63.
13. Nemazee, D., *Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 728-40.
14. Melchers, F., et al., *Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 33-46.
15. von Boehmer, H. and F. Melchers, *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 14-20.
16. Nemazee, D., *Receptor selection in B and T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 19-51.
17. Pierce, S.K., *Lipid rafts and B-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 96-105.
18. Zikherman, J., R. Parameswaran, and A. Weiss, *Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 160-4.
19. Niiro, H. and E.A. Clark, *Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 945-56.
20. Girard, J.P., C. Mousson, and R. Forster, *HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 762-73.
21. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.
22. Batista, F.D. and N.E. Harwood, *The who, how and where of antigen presentation to B cells*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(1): p. 15-27.

23. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 323-35.
24. Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud, *Human marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 267-85.
25. Dorshkind, K. and E. Montecino-Rodriguez, *Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 213-9.
26. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *Early events in B cell activation*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 185-210.
27. Gonzalez, S.F., et al., *Trafficking of B cell antigen in lymph nodes*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 215-33.
28. Chaudhuri, J. and F.W. Alt, *Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 541-52.
29. Odegard, V.H. and D.G. Schatz, *Targeting of somatic hypermutation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 573-83.
30. Woof, J.M. and D.R. Burton, *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 89-99.
31. Willard-Mack, C.L., *Normal structure, function, and histology of lymph nodes*. Toxicol Pathol, 2006. **34**(5): p. 409-24.
32. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 867-78.
33. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 360-70.
34. Liu, W., et al., *Antigen affinity discrimination is an intrinsic function of the B cell receptor*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1095-111.
35. Stepanek, O., et al., *Nonredundant roles of Src-family kinases and Syk in the initiation of B-cell antigen receptor signaling*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1807-18.
36. Matsuuchi, L. and M.R. Gold, *New views of BCR structure and organization*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(3): p. 270-7.
37. Treanor, B., *B-cell receptor: from resting state to activate*. Immunology, 2012. **136**(1): p. 21-7.
38. Gupta, N. and A.L. DeFranco, *Lipid rafts and B cell signaling*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(5): p. 616-26.
39. Depoil, D., et al., *CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 63-72.
40. Rolli, *Amplification of BCR signaling by a Syk ITAM positive feedback loop*. Mol Cell, 2002.
41. Mukherjee, S., et al., *Monovalent and multivalent ligation of the B cell receptor exhibit differential dependence upon Syk and Src family kinases*. Sci Signal, 2013. **6**(256): p. ra1.
42. Alsadeq, A., et al., *The role of the Syk/Shp-1 kinase-phosphatase equilibrium in B cell development and signaling*. J Immunol, 2014. **193**(1): p. 268-76.
43. Taniguchi, T., et al., *Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis*. J Biol Chem, 1991. **266**(24): p. 15790-6.
44. Yanagi, S., et al., *Syk expression and novel function in a wide variety of tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(3): p. 495-8.
45. Au-Yeung, B.B., et al., *A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. E3679-88.
46. Cheng, A.M., et al., *Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 303-6.

47. Turner, M., et al., *Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 298-302.
48. Turner, M., et al., *Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2013-21.
49. Chan, A.C., et al., *ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain*. Cell, 1992. **71**(4): p. 649-62.
50. Mocsai, A., J. Ruland, and V.L. Tybulewicz, *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 387-402.
51. Schweighoffer, E., et al., *Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion*. Immunity, 2003. **18**(4): p. 523-33.
52. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
53. Palacios, E.H. and A. Weiss, *Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1703-15.
54. Horejsi, V., W. Zhang, and B. Schraven, *Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 603-16.
55. Guillemins, M., et al., *The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 94-108.
56. Fuller, G.L., et al., *The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12397-409.
57. Hughes, C.E., et al., *CLEC-2 activates Syk through dimerization*. Blood, 2010. **115**(14): p. 2947-55.
58. Abtahian, F., et al., *Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(18): p. 6936-49.
59. Geahlen, R.L., *Syk and pTyr<sup>d</sup>: Signaling through the B cell antigen receptor*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(7): p. 1115-27.
60. Pawson, T., *Protein modules and signalling networks*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 573-80.
61. Furlong, M.T., et al., *Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1355**(2): p. 177-90.
62. Bohnenberger, H., et al., *Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(6): p. 1550-62.
63. Gradler, U., et al., *Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch*. J Mol Biol, 2013. **425**(2): p. 309-33.
64. Hubbard, S.R., et al., *Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 746-54.
65. Zhang, J., T. Kimura, and R.P. Siraganian, *Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4366-74.
66. Latour, S., et al., *A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2584-95.
67. Ku, G., B. Malissen, and M.G. Mattei, *Chromosomal location of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinase genes in mice and humans*. Immunogenetics, 1994. **40**(4): p. 300-2.
68. de Castro, R.O., *Regulation and function of syk tyrosine kinase in mast cell signaling and beyond*. J Signal Transduct, 2011. **2011**: p. 507291.
69. Kiefer, F., et al., *The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4209-20.
70. Coopman, P.J. and S.C. Mueller, *The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression*. Cancer Lett, 2006. **241**(2): p. 159-73.

71. Kulathu, Y., G. Grothe, and M. Reth, *Autoinhibition and adapter function of Syk*. Immunol Rev, 2009. **232**(1): p. 286-99.
72. Deindl, S., et al., *Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70*. Cell, 2007. **129**(4): p. 735-46.
73. Futterer, K., et al., *Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide*. J Mol Biol, 1998. **281**(3): p. 523-37.
74. Arias-Palomo, E., et al., *3D structure of Syk kinase determined by single-particle electron microscopy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1774**(12): p. 1493-9.
75. Arias-Palomo, E., et al., *Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(8): p. 1211-7.
76. Shiue, L., et al., *Interaction of p72syk with the gamma and beta subunits of the high-affinity receptor for immunoglobulin E, Fc epsilon RI*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 272-81.
77. Narula, S.S., et al., *Solution structure of the C-terminal SH2 domain of the human tyrosine kinase Syk complexed with a phosphotyrosine pentapeptide*. Structure, 1995. **3**(10): p. 1061-73.
78. Yan, Q., et al., *Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(11): p. 2188-201.
79. Wong, L., et al., *Coupled motions in the SH2 and kinase domains of Csk control Src phosphorylation*. J Mol Biol, 2005. **351**(1): p. 131-43.
80. Latour, S., L.M. Chow, and A. Veillette, *Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22782-90.
81. Tsang, E., et al., *Molecular mechanism of the Syk activation switch*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32650-9.
82. Keshvara, L.M., et al., *Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5276-83.
83. Zhang, Y., et al., *Tyr130 phosphorylation triggers Syk release from antigen receptor by long-distance conformational uncoupling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11760-5.
84. Stupack, D.G., et al., *Matrix valency regulates integrin-mediated lymphoid adhesion via Syk kinase*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 777-88.
85. Zyss, D., et al., *The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10872-80.
86. El-Hillal, O., et al., *syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1919-24.
87. Zhang, J., et al., *Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35442-7.
88. Kurosaki, T., et al., *Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1815-23.
89. de Castro, R.O., et al., *Tyrosines in the carboxyl terminus regulate Syk kinase activity and function*. J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26674-84.
90. Paris, L.L., et al., *Regulation of Syk by phosphorylation on serine in the linker insert*. J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39844-54.
91. Hong, J.J., et al., *Regulation of signaling in B cells through the phosphorylation of Syk on linker region tyrosines. A mechanism for negative signaling by the Lyn tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31703-14.
92. Zhou, F., et al., *Nucleocytoplasmic trafficking of the Syk protein tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(9): p. 3478-91.

93. Ma, H., et al., *Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green fluorescent protein: differential roles for Syk and Lyn in the regulation of receptor capping and internalization.* J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1507-16.
94. Rolli, V., et al., *Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop.* Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1057-69.
95. Heizmann, B., M. Reth, and S. Infantino, *Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18563-8.
96. Uckun, F.M., et al., *Serine phosphorylation by SYK is critical for nuclear localization and transcription factor function of Ikaros.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(44): p. 18072-7.
97. Saijo, K., et al., *Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development.* Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 274-9.
98. Gauld, S.B. and J.C. Cambier, *Src-family kinases in B-cell development and signaling.* Oncogene, 2004. **23**(48): p. 8001-6.
99. Ingley, E., *Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 56-65.
100. Sato, I., et al., *Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 965-75.
101. Lowell, C.A., *Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling.* Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 631-43.
102. Xu, Y., et al., *Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative.* Immunity, 2005. **22**(1): p. 9-18.
103. Kurosaki, T., et al., *Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling.* J Exp Med, 1994. **179**(5): p. 1725-9.
104. Sindhava, V.J. and S. Bondada, *Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 372.
105. Sen, G., et al., *Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells.* Eur J Immunol, 1999. **29**(10): p. 3319-28.
106. Fu, C., et al., *BLNK: a central linker protein in B cell activation.* Immunity, 1998. **9**(1): p. 93-103.
107. Wienands, J., et al., *SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation.* J Exp Med, 1998. **188**(4): p. 791-5.
108. Clements, J.L., et al., *SLP-76 expression is restricted to hemopoietic cells of monocyte, granulocyte, and T lymphocyte lineage and is regulated during T cell maturation and activation.* J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3880-9.
109. Minegishi, Y., et al., *An essential role for BLNK in human B cell development.* Science, 1999. **286**(5446): p. 1954-7.
110. Grabbe, A. and J. Wienands, *Human SLP-65 isoforms contribute differently to activation and apoptosis of B lymphocytes.* Blood, 2006. **108**(12): p. 3761-8.
111. Lagresle-Peyrou, C., et al., *The BLNK adaptor protein has a nonredundant role in human B-cell differentiation.* J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(1): p. 145-54.
112. Pappu, R., et al., *Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development.* Science, 1999. **286**(5446): p. 1949-54.
113. Jumaa, H., et al., *Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65.* Immunity, 1999. **11**(5): p. 547-54.
114. Kohler, F., et al., *A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65.* Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 204-10.

115. Oellerich, T., et al., *SLP-65 phosphorylation dynamics reveals a functional basis for signal integration by receptor-proximal adaptor proteins*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(7): p. 1738-50.
116. Chiu, C.W., et al., *BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins*. EMBO J, 2002. **21**(23): p. 6461-72.
117. Engelke, M., et al., *Cutting edge: feed-forward activation of phospholipase Cgamma2 via C2 domain-mediated binding to SLP65*. J Immunol, 2013. **191**(11): p. 5354-8.
118. Engelke, M., et al., *Macromolecular assembly of the adaptor SLP-65 at intracellular vesicles in resting B cells*. Sci Signal, 2014. **7**(339): p. ra79.
119. Engels, N., B. Wollscheid, and J. Wienands, *Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2126-34.
120. Kabak, S., et al., *The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2524-35.
121. Conley, M.E., et al., *Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse*. Immunol Rev, 2000. **178**: p. 75-90.
122. Baba, Y., et al., *BLNK mediates Syk-dependent Btk activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2582-6.
123. Yang, W.C., et al., *Tec kinases: a family with multiple roles in immunity*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 373-82.
124. Vihinen, M., L. Nilsson, and C.I. Smith, *Tec homology (TH) adjacent to the PH domain*. FEBS Lett, 1994. **350**(2-3): p. 263-5.
125. Kurosaki, T. and M. Kurosaki, *Transphosphorylation of Bruton's tyrosine kinase on tyrosine 551 is critical for B cell antigen receptor function*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15595-8.
126. Hashimoto, S., et al., *Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling*. Blood, 1999. **94**(7): p. 2357-64.
127. Park, H., et al., *Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain*. Immunity, 1996. **4**(5): p. 515-25.
128. Kang, S.W., et al., *PKCbeta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5692-702.
129. Kurosaki, T., *Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 354-63.
130. Rickert, R.C., *New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(8): p. 578-91.
131. Kadamur, G. and E.M. Ross, *Mammalian phospholipase C*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 127-54.
132. Wilde, J.I. and S.P. Watson, *Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other?* Cell Signal, 2001. **13**(10): p. 691-701.
133. Wang, D., et al., *Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 25-35.
134. Everett, K.L., et al., *Membrane environment exerts an important influence on rac-mediated activation of phospholipase Cgamma2*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(6): p. 1240-51.
135. Gresset, A., et al., *Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35836-47.
136. Bunney, T.D., et al., *Structural and functional integration of the PLCgamma interaction domains critical for regulatory mechanisms and signaling deregulation*. Structure, 2012. **20**(12): p. 2062-75.



137. Ishiai, M., et al., *BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 117-25.
138. Ishiai, M., et al., *Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 1746-9.
139. Aman, M.J. and K.S. Ravichandran, *A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux*. Curr Biol, 2000. **10**(7): p. 393-6.
140. Rodriguez, R., et al., *Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47982-92.
141. Kim, Y.J., et al., *Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(22): p. 9986-99.
142. Patterson, R.L., et al., *Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced Ca2+ entry*. Cell, 2002. **111**(4): p. 529-41.
143. Oberley, M.J., D.S. Wang, and D.T. Yang, *Vav1 in hematologic neoplasms, a mini review*. Am J Blood Res, 2012. **2**(1): p. 1-8.
144. Vigorito, E., et al., *Vav proteins regulate peripheral B-cell survival*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2391-8.
145. Katzav, S., *Vav1: a hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(6): p. 1245-8.
146. Turner, M. and D.D. Billadeau, *VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 476-86.
147. Chen, C.H., et al., *Two closely spaced tyrosines regulate NFAT signaling in B cells via Syk association with Vav*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(14): p. 2984-96.
148. Lazer, G., et al., *The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumourigenesis*. J Pathol, 2009. **219**(1): p. 25-34.
149. Aghazadeh, B., et al., *Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation*. Cell, 2000. **102**(5): p. 625-33.
150. Houliard, M., et al., *Vav1 is a component of transcriptionally active complexes*. J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1115-27.
151. Katzav, S., et al., *Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 1912-20.
152. Hornstein, I., et al., *The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas*. J Pathol, 2003. **199**(4): p. 526-33.
153. Fernandez-Zapico, M.E., et al., *Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis*. Cancer Cell, 2005. **7**(1): p. 39-49.
154. Sebban, S., et al., *Vav1 fine tunes p53 control of apoptosis versus proliferation in breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54321.
155. Weber, M., et al., *Phospholipase C-gamma2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 853-68.
156. Saveliev, A., et al., *Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation*. Sci Signal, 2009. **2**(101): p. ra83.
157. Okkenhaug, K. and B. Vanhaesebroeck, *PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 317-30.
158. Fruman, D.A. and L.C. Cantley, *Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems*. Semin Immunol, 2002. **14**(1): p. 7-18.
159. Moon, K.D., et al., *Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1543-51.

160. Vanhaesebroeck, B., et al., *Autophosphorylation of p110delta phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo*. EMBO J, 1999. **18**(5): p. 1292-302.
161. Wang, W., et al., *Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation*. J Cell Biochem, 2011. **112**(8): p. 2062-71.
162. Zhang, J., A.K. Somani, and K.A. Siminovitch, *Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(4): p. 361-78.
163. Lorenz, U., *SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 342-59.
164. Xiao, W., et al., *Lyn- and PLC-beta3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease*. Blood, 2010. **116**(26): p. 6003-13.
165. Mustelin, T., T. Vang, and N. Bottini, *Protein tyrosine phosphatases and the immune response*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 43-57.
166. Huang, F. and H. Gu, *Negative regulation of lymphocyte development and function by the Cbl family of proteins*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 229-38.
167. Bachmaier, K., et al., *Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b*. Nature, 2000. **403**(6766): p. 211-6.
168. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 294-307.
169. Lupher, M.L., Jr., et al., *Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35273-81.
170. Yankee, T.M., et al., *Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5827-35.
171. Kitaura, Y., et al., *Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 567-78.
172. Swaminathan, G. and A.Y. Tsygankov, *The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling*. J Cell Physiol, 2006. **209**(1): p. 21-43.
173. Sohn, H.W., H. Gu, and S.K. Pierce, *Cbl-b negatively regulates B cell antigen receptor signaling in mature B cells through ubiquitination of the tyrosine kinase Syk*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1511-24.
174. Kurosaki, T., *Regulation of BCR signaling*. Mol Immunol, 2011. **48**(11): p. 1287-91.
175. Scharenberg, A.M., L.A. Humphries, and D.J. Rawlings, *Calcium signalling and cell-fate choice in B cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 778-89.
176. Engelke, M., et al., *Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 235-46.
177. Baba, Y. and T. Kurosaki, *Impact of Ca2+ signaling on B cell function*. Trends Immunol, 2011. **32**(12): p. 589-94.
178. Davids, M.S. and J.A. Burger, *Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Open J Hematol, 2012. **3**(S1).
179. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-7.
180. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
181. Del Giudice, I., et al., *Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases*. Blood, 2009. **114**(3): p. 638-46.
182. Kikushige, Y., et al., *Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Cell, 2011. **20**(2): p. 246-59.

183. Damm, F., et al., *Acquired Initiating Mutations in Early Hematopoietic Cells of CLL Patients*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(9): p. 1088-101.
184. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. *Cancer*, 1981. **48**(1): p. 198-206.
185. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1975. **46**(2): p. 219-34.
186. Pflug, N., et al., *Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2014. **124**(1): p. 49-62.
187. Tam, C.S. and J.F. Seymour, *A new prognostic score for CLL*. *Blood*, 2014. **124**(1): p. 1-2.
188. Gaidano, G., R. Foa, and R. Dalla-Favera, *Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(10): p. 3432-8.
189. Sato, S., et al., *Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19*. *J Immunol*, 1997. **159**(7): p. 3278-87.
190. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. *J Exp Med*, 1999. **190**(1): p. 75-89.
191. Fujimoto, M., et al., *Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 191-200.
192. Oppezzo, P. and G. Dighiero, *"Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia"*. *Blood Cancer J*, 2013. **3**: p. e149.
193. Tarnani, M., et al., *The proliferative response to CpG-ODN stimulation predicts PFS, TTT and OS in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Res*, 2010. **34**(9): p. 1189-94.
194. Puente, X.S., et al., *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. *Nature*, 2011. **475**(7354): p. 101-5.
195. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. *J Exp Med*, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
196. Wiestner, A., et al., *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4944-51.
197. Apollonio, B., et al., *Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2013. **121**(19): p. 3879-88, S1-8.
198. Chiorazzi, N., K. Hatzi, and E. Albesiano, *B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1062**: p. 1-12.
199. Deglesne, P.A., et al., *Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression*. *Cancer Res*, 2006. **66**(14): p. 7158-66.
200. Hamblin, T.J. and D.G. Oscier, *Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell*. *Blood Rev*, 1997. **11**(3): p. 119-28.
201. Wolowiec, D., et al., *High intracellular content of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in early- and intermediate stage B-cell chronic lymphocytic leukemia lymphocytes predicts rapid progression of the disease*. *Eur J Haematol*, 2009. **82**(4): p. 260-6.
202. Messmer, B.T., et al., *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 755-64.
203. Bruey, J.M., et al., *Circulating Ki-67 index in plasma as a biomarker and prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Res*, 2010. **34**(10): p. 1320-4.
204. Lagneaux, L., et al., *Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells*. *Blood*, 1998. **91**(7): p. 2387-96.

205. Burger, J.A., *Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 96-103.
206. Sivina, M., et al., *CCL3 (MIP-1alpha) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1662-9.
207. Burger, J.A., et al., *High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation*. Blood, 2009. **113**(13): p. 3050-8.
208. Burger, J.A. and J.G. Gribben, *The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies*. Semin Cancer Biol, 2014. **24**: p. 71-81.
209. Ramsay, A.G., et al., *Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2427-37.
210. Malavasi, F., et al., *CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later*. Blood, 2011. **118**(13): p. 3470-8.
211. Zhang, S. and T.J. Kipps, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 103-18.
212. Sivina, M., et al., *Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2012. **26**(8): p. 1812-20.
213. Herishanu, Y., et al., *The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **117**(2): p. 563-74.
214. Vlad, A., et al., *Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease*. Cancer Res, 2009. **69**(16): p. 6387-95.
215. Borge, M., et al., *The expression of sphingosine-1 phosphate receptor-1 in chronic lymphocytic leukemia cells is impaired by tumor microenvironmental signals and enhanced by piceatannol and r406*. J Immunol, 2014. **193**(6): p. 3165-74.
216. Quiroga, M.P., et al., *B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406*. Blood, 2009. **114**(5): p. 1029-37.
217. Friedberg, J.W., et al., *Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2010. **115**(13): p. 2578-85.
218. Dighiero, G., et al., *B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL*. Blood, 1991. **78**(8): p. 1901-14.
219. Stevenson, F.K., et al., *B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **118**(16): p. 4313-20.
220. Packham, G., et al., *The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1138-48.
221. Krysov, S., et al., *Surface IgM of CLL cells displays unusual glycans indicative of engagement of antigen in vivo*. Blood, 2010. **115**(21): p. 4198-205.
222. Vuillier, F., et al., *Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2933-40.
223. Alfarano, A., et al., *An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2327-35.

224. Gordon, M.S., et al., *Aberrant B cell receptor signaling from B29 (Igbeta, CD79b) gene mutations of chronic lymphocytic leukemia B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5504-9.
225. Chiorazzi, N. and D.G. Efremov, *Chronic lymphocytic leukemia: a tale of one or two signals?* Cell Res, 2013. **23**(2): p. 182-5.
226. Feng, G. and X. Wang, *Role of spleen tyrosine kinase in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2014.
227. Duhren-von Minden, M., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 309-12.
228. Lankester, A.C., et al., *Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Blood, 1995. **86**(3): p. 1090-7.
229. Nedellec, S., et al., *B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3749-56.
230. Vallat, L.D., et al., *Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3989-97.
231. Buchner, M., et al., *Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2010. **115**(22): p. 4497-506.
232. Carsetti, L., et al., *Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation*. Cell Signal, 2009. **21**(7): p. 1187-94.
233. Gobessi, S., et al., *Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Leukemia, 2009. **23**(4): p. 686-97.
234. Talab, F., et al., *LCK is an important mediator of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(5): p. 541-54.
235. Brown, J.R., et al., *Systematic genomic screen for tyrosine kinase mutations in CLL*. Leukemia, 2008. **22**(10): p. 1966-9.
236. Philippen, A., et al., *SYK carries no activating point mutations in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL)*. Br J Haematol, 2010. **150**(5): p. 633-6.
237. Seda, V. and M. Mraz, *B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells*. Eur J Haematol, 2014.
238. Gururajan, M., C.D. Jennings, and S. Bondada, *Cutting Edge: Constitutive B Cell Receptor Signaling Is Critical for Basal Growth of B Lymphoma*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(10): p. 5715-5719.
239. Kuno, Y., et al., *Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12)*. Blood, 2001. **97**(4): p. 1050-5.
240. Kanie, T., et al., *TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways*. Leukemia, 2004. **18**(3): p. 548-55.
241. Hug, E., et al., *Inducible expression of hyperactive Syk in B cells activates Blimp-1-dependent terminal differentiation*. Oncogene, 2014. **33**(28): p. 3730-41.
242. Hussain, A., et al., *Signaling of the ITK (interleukin 2-inducible T cell kinase)-SYK (spleen tyrosine kinase) fusion kinase is dependent on adapter SLP-76 and on the adapter function of the kinases SYK and ZAP70*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): p. 7338-50.
243. Hussain, A., et al., *TEC family kinases in health and disease--loss-of-function of BTK and ITK and the gain-of-function fusions ITK-SYK and BTK-SYK*. FEBS J, 2011. **278**(12): p. 2001-10.
244. Goodman, P.A., et al., *Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia*. Oncogene, 2001. **20**(30): p. 3969-78.

245. Contri, A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 369-78.
246. Tibaldi, E., et al., *Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2011. **25**(11): p. 1768-81.
247. Majolini, M.B., et al., *Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3390-6.
248. Chen, L., et al., *Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4609-14.
249. Chen, L., et al., *ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2036-41.
250. Gobessi, S., et al., *ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2032-9.
251. Chen, L., et al., *ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2685-92.
252. Laurenti, L., et al., *Comparison of ZAP-70/Syk mRNA levels with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status and disease progression in chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2005. **90**(11): p. 1533-40.
253. Herman, S.E., et al., *Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6287-96.
254. Efremov, D.G., S. Gobessi, and P.G. Longo, *Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells*. Autoimmun Rev, 2007. **7**(2): p. 102-8.
255. Ponader, S., et al., *The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo*. Blood, 2012. **119**(5): p. 1182-9.
256. Kil, L.P., et al., *Bruton's tyrosine kinase mediated signaling enhances leukemogenesis in a mouse model for chronic lymphocytic leukemia*. Am J Blood Res, 2013. **3**(1): p. 71-83.
257. Buchner, M., et al., *Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5424-32.
258. Palomba, M.L., et al., *Multidimensional single-cell analysis of BCR signaling reveals proximal activation defect as a hallmark of chronic lymphocytic leukemia B cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e79987.
259. Song, Z., et al., *Activities of SYK and PLCgamma2 predict apoptotic response of CLL cells to SRC tyrosine kinase inhibitor dasatinib*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 587-99.
260. Woyach, J.A., et al., *Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib*. N Engl J Med, 2014. **370**(24): p. 2286-94.
261. Prieto-Sanchez, R.M., et al., *Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q*. Br J Haematol, 2006. **133**(6): p. 642-5.
262. Zucchetto, A., et al., *The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2012. **26**(6): p. 1301-12.
263. Brown, J.R., et al., *Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2014. **123**(22): p. 3390-7.
264. Herman, S.E., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2078-88.

265. Lannutti, B.J., et al., *CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 591-4.
266. Ringshausen, I., et al., *Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3741-8.
267. 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*, 2008. **111**(2): p. 846-55.
268. Niedermeier, M., et al., *Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach*. *Blood*, 2009. **113**(22): p. 5549-57.
269. Efremov, D.G., A. Wiestner, and L. Laurenti, *Novel Agents and Emerging Strategies for Targeting the B-Cell Receptor Pathway in CLL*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012. **4**(1): p. e2012067.
270. Negro, R., et al., *Overexpression of the autoimmunity-associated phosphatase PTPN22 promotes survival of antigen-stimulated CLL cells by selectively activating AKT*. *Blood*, 2012. **119**(26): p. 6278-87.
271. Reth, M. and T. Brummer, *Feedback regulation of lymphocyte signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(4): p. 269-77.
272. Renaudineau, Y., et al., *Role of B-cell antigen receptor-associated molecules and lipid rafts in CD5-induced apoptosis of B CLL cells*. *Leukemia*, 2005. **19**(2): p. 223-9.
273. Mankai, A., et al., *Is the c-Cbl proto-oncogene involved in chronic lymphocytic leukemia?* *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1107**: p. 193-205.
274. Petlickovski, A., et al., *Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4820-7.
275. Baudot, A.D., et al., *The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression*. *Oncogene*, 2009. **28**(37): p. 3261-73.
276. Muzio, M., et al., *Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy*. *Blood*, 2008. **112**(1): p. 188-95.
277. Palacios, F., et al., *Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation*. *Leukemia*, 2014.
278. Davids, M.S. and J.R. Brown, *Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2012. **53**(12): p. 2362-70.
279. Tausch, E., D. Mertens, and S. Stilgenbauer, *Advances in treating chronic lymphocytic leukemia*. *F1000Prime Rep*, 2014. **6**: p. 65.
280. Yamauchi, T., et al., *DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(11): p. 3580-9.
281. Pettitt, A.R., *Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(5): p. 692-702.
282. Gandhi, V., *Metabolism and mechanisms of action of bendamustine: rationales for combination therapies*. *Semin Oncol*, 2002. **29**(4 Suppl 13): p. 4-11.
283. Ramsay, A.G. and J.G. Gribben, *Immune dysfunction in chronic lymphocytic leukemia T cells and lenalidomide as an immunomodulatory drug*. *Haematologica*, 2009. **94**(9): p. 1198-202.
284. Ten Hacken, E. and J.A. Burger, *Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies*. *Pharmacol Ther*, 2014.

285. De Clercq, E., *The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil)*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **77**(11): p. 1655-64.
286. Braselmann, S., et al., *R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **319**(3): p. 998-1008.
287. Slupsky, J.R., *Does B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells differ from that in other B cell types?* *Scientifica (Cairo)*, 2014. **2014**: p. 208928.
288. Weinblatt, M.E., et al., *An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(14): p. 1303-12.
289. Hoellenriegel, J., et al., *Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration*. *Leukemia*, 2012. **26**(7): p. 1576-83.
290. Spurgeon, S.E., et al., *The selective SYK inhibitor P505-15 (PRT062607) inhibits B cell signaling and function in vitro and in vivo and augments the activity of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013. **344**(2): p. 378-87.
291. Burke, R.T., et al., *A potential therapeutic strategy for chronic lymphocytic leukemia by combining Idelalisib and GS-9973, a novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor*. *Oncotarget*, 2014. **5**(4): p. 908-15.
292. Hoellenriegel, J., et al., *The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2011. **118**(13): p. 3603-12.
293. Pleyer, L., et al., *Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. **6**(7): p. 405-18.
294. Le Roy, C., et al., *The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2012. **120**(2): p. 356-65.
295. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. *Blood*, 2004. **103**(12): p. 4389-95.
296. Ternynck, T., et al., *Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. I. Detection and quantitation of light chain determinants*. *Blood*, 1974. **43**(6): p. 789-95.
297. Pierce, S.K. and W. Liu, *The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(11): p. 767-77.
298. Dighiero, G. and T.J. Hamblin, *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Lancet*, 2008. **371**(9617): p. 1017-29.
299. Krysov, S., et al., *Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells*. *Blood*, 2012. **119**(1): p. 170-9.
300. Potter, K.N., et al., *Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(6): p. 1672-9.
301. Fung-Leung, W.P., *Phosphoinositide 3-kinase delta (PI3Kdelta) in leukocyte signaling and function*. *Cell Signal*, 2011. **23**(4): p. 603-8.
302. Dustin, L.B., et al., *Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2717-24.
303. Yasuda, T., et al., *Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C (PLC)-gamma2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-gamma2 binding*. *J Exp Med*, 2000. **191**(4): p. 641-50.
304. Kant, A.M., et al., *SHP-1 regulates Fc gamma receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1852-9.



305. Joshi, S., et al., *A PKC-SHP1 signaling axis desensitizes Fcγ receptor signaling by reducing the tyrosine phosphorylation of CBL and regulates FcγR mediated phagocytosis.* BMC Immunol, 2014. **15**: p. 18.
306. Muller, M.R. and A. Rao, *NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 645-56.
307. Marafioti, T., et al., *The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas.* Br J Haematol, 2005. **128**(3): p. 333-42.
308. Guinamard, R., et al., *B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1α chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4.* J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1461-6.
309. Matthews, S.A., et al., *Unique functions for protein kinase D1 and protein kinase D2 in mammalian cells.* Biochem J, 2010. **432**(1): p. 153-63.
310. Kovalevska, L.M., et al., *Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas.* Exp Oncol, 2006. **28**(3): p. 225-30.
311. Sharlow, E.R., et al., *Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxolazepinolone.* J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33516-26.
312. Fu, Y. and C.S. Rubin, *Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology.* EMBO Rep, 2011. **12**(8): p. 785-96.
313. Matthews, S.A., E. Rozengurt, and D. Cantrell, *Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cμ.* J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26543-9.
314. Busillo, J.M., et al., *Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling.* J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7805-17.
315. Orsini, M.J., et al., *Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization.* J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 31076-86.
316. Matthews, S.A., et al., *Regulation of protein kinase Cα by the B-cell antigen receptor.* J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9086-91.
317. Pracht, C., et al., *Association of protein kinase C-δ with the B cell antigen receptor complex.* Cell Signal, 2007. **19**(4): p. 715-22.
318. Vigorito, E., D. Kovesdi, and M. Turner, *Synergistic activation of PKD by the B cell antigen receptor and CD19 requires PI3K, Vav1 and PLCγ.* Cell Signal, 2006. **18**(9): p. 1455-60.
319. Aramburu, J., et al., *Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A.* Science, 1999. **285**(5436): p. 2129-33.
320. Banan, A., et al., *Phospholipase C-γ inhibition prevents EGF protection of intestinal cytoskeleton and barrier against oxidants.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(2): p. G412-23.

Des altérations de la signalisation en aval du récepteur à l'antigène (BCR) jouent un rôle clé dans la physiopathologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC). Notre laboratoire a montré qu'une stimulation antigénique *ex-vivo* des cellules B-LLC conduit à une survie et une migration cellulaires différentielles qui distingue deux groupes de patients. Sur la base de ces résultats, nous avons montré que l'avantage de survie cellulaire en réponse à une stimulation antigénique observé dans un groupe est dépendant 1) d'un seuil imposé par les niveaux d'expression des effecteurs précoces (BCR, Syk et Zap70), de la capacité des cellules leucémiques à répondre en termes de phosphorylation de Syk, d'activation de la PLC $\gamma$ 2, de mobilisation calcique et d'activation du facteur de transcription NFAT2 ; l'activation de la voie BCR/NFAT mesurée par la survie des cellules B-LLC *ex-vivo* étant corrélée à la survie globale des patients ; 2) de l'augmentation des niveaux de phosphorylation globale et spécifique de Syk, de la distribution subcellulaire de phospho-Syk, de la capacité de Syk à interagir avec des effecteurs positifs et négatifs et à les activer. De plus, notre étude sur la diminution de la migration des cellules B de LLC en réponse à une stimulation du BCR montre qu'elle dépend du taux d'internalisation du CXCR4 qui est régulé par l'activation des PI3Ks situées en amont des PKDs ; ces dernières activées phosphorylent le CXCR4 qui est alors internalisé. L'ensemble de ces données nous a permis de mieux définir les mécanismes moléculaires sous-jacents à une survie accrue et à une migration diminuée des cellules B-LLC en réponse à une stimulation antigénique, de mettre en évidence d'éventuels biomarqueurs fonctionnels de stratification (pSyk et pPLC $\gamma$ 2), de pointer de potentielles cibles thérapeutiques (NFATs et PKDs) et d'expliquer en partie l'action de drogues, comme le Fostamatinib et l'Idelalisib, utilisées en thérapie dans la LLC.

---

### **Functional alterations of antigen-induced B cell Receptor signaling in B cells from Chronic Lymphocytic Leukemia patients.**

Altered B-cell antigen receptor (BCR) signaling pathways play a key role in chronic lymphocytic leukemia (CLL) pathophysiology. Our lab has previously shown that *ex-vivo* antigenic stimulation of CLL-B cells led to differential cell survival and cell migration, which allowed the distinction between two groups of patients. Based on these results, we evidenced that the cell survival advantage in response to BCR engagement from one group depends on 1) a critical threshold mediated by the early effector expression levels (BCR, Syk et Zap70), a BCR competency of the leukemic cells translated by Syk phosphorylation, PLC $\gamma$ 2 activation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and the transcription factor NFAT2 activation; this activated BCR/NFAT signaling cascade, which is reflected by the *ex-vivo* measurement of CLL cell survival, was correlated to the overall survival from CLL patients; 2) increased levels of global and specific Syk phosphorylation, phospho-Syk subcellular distribution, Syk ability to interact with positive and negative effectors and to activate them. Moreover, study of BCR stimulation-mediated decreased migration in CLL B cells showed that it relied on CXCR4 internalization levels that were regulated by activated PI3Ks acting upstream of the PKDs; activation of the latter allowed CXCR4 phosphorylation and then its endocytosis. Altogether, these data allowed us to better understand the molecular mechanisms underlying the survival advantage and the decreased migration of CLL B cells in response to antigenic stimulation, to evidence eventual functional biomarkers of stratification (pSyk and pPLC $\gamma$ 2), to point out potential therapeutic targets (NFATs and PKDs), and to partially explain how Fostamatinib and Idelalisib function as therapeutic drugs in CLL.

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Mots-clés: Leucémie Lymphoïde Chronique, lymphocyte B, Récepteur à l'antigène des cellules B, Survie, Migration, Syk, PLC $\gamma$ 2, CXCR4, PKD, phosphorylation.

UMR 978 INSERM - Université Paris 13, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny