

Nom du laboratoire :

UMR978 INSERM-Université Sorbonne Paris Nord « Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B » SIMHEL

Nom de la directrice de thèse et ses coordonnées :

Dr Christine LE ROY, CRCN INSERM, HDR

UMR978, UFR-SMBH, pièce 18, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY

Email : christine.le-roy@inserm.fr

Téléphone : **01 48 38 88 58**

Titre : Etude structurale et fonctionnelle de la protéine Syk dans les cellules B normales et de Leucémie Lymphoïde Chronique

Projet de thèse :

Au sein du système immunitaire, les lymphocytes B sont des acteurs majeurs de la réponse à l'antigène. Cette dernière dépend de l'expression des récepteurs membranaires (BCR) et de leurs effecteurs intracellulaires de signalisation. Les lymphocytes modulent également la réponse immunitaire pendant leur trafic d'un organe à un autre (sang, moelle osseuse et organes lymphoïdes secondaires) en établissant un dialogue direct et/ou indirect avec différents types cellulaires du microenvironnement. La survie ou l'apoptose, la prolifération, la différenciation, l'anergie, la capacité à migrer, à adhérer et à sécréter des facteurs solubles des lymphocytes B sont notamment dépendantes de la voie du BCR et de son effecteur clé, Syk, une tyrosine kinase cytoplasmique constituée de 2 domaines SH2, de 2 inter-domaines et d'un domaine kinase. Ces différentes réponses biologiques résultent d'un engagement du BCR membranaire et provoquent la phosphorylation séquentielle de Syk qui module ainsi sa sélectivité de liaison et d'activité au sein d'un signalosome dynamique. Ce signalosome est constitué de kinases, phosphatases, phospholipases et d'adaptateurs, qui finalement activent des facteurs de transcription spécifiques. Le modèle actuellement proposé de l'activation de la protéine serait que Syk existe sous deux états conformationnels : une conformation auto-inhibée/non phosphorylée et une conformation ouverte/phosphorylée générée après association de ses SH2 aux motifs phosphorylés de la région intracellulaire du BCR et phosphorylation sur son ses inter-domaines et son domaine kinase. *Des travaux du laboratoire ont démontré in vitro que le statut de phosphorylation de Syk s'apparente à plus d'une conformation. Cependant, l'existence et l'impact fonctionnel de ces variants structuraux phosphorylés ne sont pas encore élucidés dans les cellules B normales et pathologiques.*

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) résulte de l'expansion d'une sous-population de cellules B matures. Le BCR présent sur ces lymphocytes et sa signalisation jouent un rôle central dans le développement, la progression et la résistance aux traitements de la maladie. Les cellules B s'accumulent dans le sang, la moelle osseuse, la rate et les ganglions des patients où elles dialoguent avec différents types cellulaires pour induire des réponses biologiques adaptées permettant, entre autres, d'augmenter leur survie et d'inhiber leur apoptose. *Des travaux publiés du laboratoire révèlent que, suite à un engagement du BCR, l'avantage de survie des lymphocytes B chez les patients progressifs est lié au niveau d'expression et de phosphorylation globale de Syk. D'autres résultats de l'équipe démontrent que l'avantage de survie est lié aux niveaux de phosphorylation sur certains résidus tyrosine de Syk, de sa localisation subcellulaire, de sa capacité de liaison à des effecteurs du signalosome et de sa sensibilité à l'inhibition de son activité kinase. Ces résultats suggèrent que le modèle d'activation de Syk diffère entre les cellules B de LLC des patients indolents ou progressifs, en termes de phosphorylations de Syk, de son activité kinase et des voies de signalisation activées.*

L'objectif de ce projet de thèse consiste donc à étudier la relation qui existe entre la structure et les fonctions de Syk phosphorylée dans les réponses cellulaires des cellules B normales et de LLC.

1) Sur la base de l'existence de diverses conformations de Syk liées à son niveau de phosphorylation, différents mutants des sites de phosphorylation de Syk impliqués dans son activation seront générés par mutagenèse dirigée. Ces mutants seront exprimés dans des cellules B, normales ou de LLC, après que l'expression endogène de Syk ait été abolie par ARN interférence et/ou que l'activité kinase de Syk ait été diminuée par un inhibiteur spécifique. L'impact fonctionnel des mutants de Syk sera estimé sur la survie cellulaire par des mesures en cytométrie en flux de la prolifération cellulaire (Ki67) et de l'apoptose (Annexin V/Iodure de Propidium). Leur impact sera également évalué sur la capacité de dialogue entre les cellules B et les autres cellules immunes ou stromales par un dosage ELISA des taux de chimiokines CCL3 et CCL4 impliqués notamment dans l'attraction des lymphocytes T et des monocytes/Nurse Like Cells (collaboration avec E. Dondi de l'Unité), du facteur de croissance TGF β 1 participant avec l'IL-10 dans la conversion des T conventionnels en Tregs et, de la lymphotoxine $\alpha\beta$ nécessaire à l'interaction des cellules B avec les cellules folliculaires dendritiques des organes lymphoïdes secondaires. L'impact des mutants sera enfin déterminé sur la capacité des cellules B à adhérer aux cellules stromales (médullaires et ganglionnaires, collaboration avec L. Gardano de l'Unité) et à des matrices extracellulaires (fibronectine et VCAM-1) par un comptage cellulaire et par quantification concomitante par cytométrie en flux des niveaux d'expression membranaire des intégrines ($-\alpha$ 4, CD49d et $-\beta$ 1, CD29) constituant VLA-4. **Ces résultats devraient identifier les variants de Syk qui potentialisent ou inhibent certaines réponses biologiques des cellules B.**

2) En réponse à une stimulation, les BCR forment des micro-clusters dans les radeaux lipidiques présents à la surface des cellules B. S'en suit un recrutement des SFK (Lyn, Fyn, Blk) qui phosphorylent la partie intracellulaire des BCR et permet l'ancrage de Syk qui est alors multiphosphorylée par les SFK et par elle-même. Dans le signalosome, Syk phosphoryle des protéines adaptatrices (BLNK, SHC) qui recrutent divers effecteurs positifs (VAV, RAS, PI3Kd, PKD, Btk, PLC γ 2) et négatifs (SHP-1, PTPN22, PTEN, SHIP1, Cbl) des voies de signalisation pour l'activation ou l'inhibition de nombreux facteurs de transcription. Les mutants de Syk pour les résidus clés du modèle d'activation seront surexprimés dans des cellules B déficientes en Syk (DT40 *Syk*^{-/-}), stimulées en présence ou non d'un antigène, et les radeaux lipidiques purifiés. Une analyse de leur distribution subcellulaire par western blot caractérisera les mutants qui sont présents ou absents de ces plateformes de signalisation. Une analyse par protéomique comparative permettra d'identifier les protéines présentes, SFK, adaptateurs et effecteurs, dans cette fraction subcellulaire. Parallèlement à la cartographie protéique des signalosomes pour chaque mutant de Syk, une approche RNA Flow/Protéine Flow des DT40 *Syk*^{-/-}, surexprimant les différents mutants de Syk, permettra de quantifier les niveaux d'expression ARNs et protéiques des principaux facteurs de transcription impliqués (NFAT, NF κ B, FoxO, c-Myc, c-Jun) en réponse à une stimulation du BCR. **Ces expériences devraient permettre une analyse des complexes présents auprès de chaque mutant de Syk et d'établir un lien fonctionnel avec l'activation des facteurs de transcription.**

Par l'étude des réponses biologiques déclenchées par chaque mutant de Syk et par la cartographie de leurs partenaires, cette étude permettra de mieux comprendre comment les étapes successives de phosphorylation de Syk, qui conduisent à son activation, impactent la réponse des cellules B normales à une stimulation antigénique. Elle permettra également de distinguer les fonctions adaptatrice ou kinase de Syk. Enfin, cette étude structurale et fonctionnelle de Syk permettra d'élucider son implication dans les mécanismes responsables des activations autonome, tonique ou dépendante de l'antigène et du BCR dans les cellules de LLC.