



HAL
open science

Etude de la physiopathologie du récepteur FcγRIIB dans les lymphomes B malins non-Hodgkiniens

Juliana Ribeyron

► **To cite this version:**

Juliana Ribeyron. Etude de la physiopathologie du récepteur FcγRIIB dans les lymphomes B malins non-Hodgkiniens. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00136164

HAL Id: tel-00136164

<https://theses.hal.science/tel-00136164>

Submitted on 12 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
SCIENCES & GEOGRAPHIE

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Juliana RIBEYRON

Le 21 décembre 2006

ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DU RECEPTEUR F_{cy}RIIB DANS LES LYMPHOMES B MALINS NON-HODGKINIENS

Thèse dirigée par le Dr Mary CALLANAN

JURY

Pr Michel ROBERT-NICOUD

Dr Carmen GARRIDO

Dr Nuala MOONEY

Dr. Jean-Luc TEILLAUD

Dr Mary CALLANAN

Pr Dominique LEROUX

Thèse préparée au sein du Laboratoire Groupe de Recherche sur les Lymphomes
Equipe INSERM E353 dirigée par le Pr Dominique LEROUX, Institut Albert Bonniot
Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

RESUME

Le récepteur de basse affinité pour les fragments Fc des immunoglobulines G, Fc γ RIIB, joue un rôle clé dans la régulation négative des réponses immunes. Il est capable d'inhiber les fonctions cellulaires B induites par le BCR, ainsi que d'induire un processus de mort cellulaire, encore très peu caractérisée dans la littérature. Récemment, un rôle potentiel de Fc γ RIIB dans la tumorigénèse a été identifié. En particulier, la dérégulation de l'expression de Fc γ RIIB suite à des translocations chromosomiques a été rapportée dans des cas de lymphomes folliculaires. Nous avons ainsi étudié les conséquences du recrutement des récepteurs Fc γ RIIB dans des lignées de lymphome B. Pour cela nous avons utilisé trois lignées de lymphome B et des lymphocytes B spléniques humains normaux. Les lignées des lymphome B utilisées ont été la lignée B593, lignée de lymphome folliculaire avec une très forte expression de Fc γ RIIB (t(1 ;22)) et les lignées Daudi et BL41, lignées de lymphomes de Burkitt avec un taux modéré de Fc γ RIIB. Nous montrons que le co-recrutement de récepteurs Fc γ RII à l'aide d'anticorps anti-Fc γ RII (FLI 8.26) induit la mort cellulaire de cellules de lymphome B, mais n'induit pas la mort des lymphocytes B normaux. Ce processus apoptotique dans les cellules tumorales B est dépendant et indépendant des caspases. La caractérisation plus détaillée de la mort cellulaire induite par FLI 8.26, dans la lignée B593, a montré l'implication de voies dépendante et indépendante des caspases. Nous montrons que la mort caspase dépendante est caractérisée par la libération du cytochrome c, le clivage de la caspase-9, l'activation de la caspase-3 ainsi que de la PARP et que la mort cellulaire indépendante des caspases est caractérisée par la libération d'AIF. Nous montrons que la phosphorylation des récepteurs Fc γ RIIB est un événement précoce dans la voie de signalisation apoptotique. De plus, le traitement par FLI 8.26 induit l'expression de la protéine HSP27. Nos résultats ont montré pour la première fois les mécanismes de mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante dans les lymphomes B humains. Nous suggérons que la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante pourrait ainsi, être mise à profit en thérapeutique.

REMERCIEMENTS

Il y a un temps pour tout, un temps pour toutes choses sous les cieux. Un temps pour naître, un temps pour mourir, un temps pour pleurer, un temps pour rire, un temps pour se taire, un temps pour parler. Il est temps, maintenant de remercier tous ceux qui ont cheminé avec moi pendant ces quatre années. Il est temps de remercier tous ceux qui m'ont soutenue, qui m'ont encouragée, qui m'ont aidée, qui m'ont aimée. Il est temps de remercier leur sourire, leur amitié, leur tendresse, leur amour.

Premièrement, je souhaite exprimer ma reconnaissance envers le Professeur Michel ROBERT-NICOUD, qui m'a accueillie lorsque je suis arrivée du Brésil. Je le remercie également d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je souhaite remercier vivement le Professeur Dominique LEROUX de m'avoir acceptée dans le groupe de Recherche sur les Lymphomes et de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail. Je la remercie également d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Je suis honorée que le Docteur Carmen GARRIDO et le Docteur Nuala MOONEY aient accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et que le Docteur Jean-Luc TEILLAUD ait consenti à faire partie des membres du jury.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Mary CALLANAN. Elle m'a appris très rapidement à devenir autonome. Son esprit critique, son enthousiasme, son dynamisme et son soutien m'ont toujours encouragée. Tout ce que nous avons vécu ensemble durant cette période m'a permis d'avancer et d'évoluer. Un grand merci !

Je souhaite exprimer toute mon admiration pour le Docteur Alicia LAJMANOVICH. Elle a été toujours disponible. Son esprit scientifique, ses conseils précieux et tout simplement son amitié ont été très importants pour moi. Je te remercie du fond du cœur. Obrigada amiga !

Je remercie chaleureusement le Docteur Thierry BONNEFOIX. Ses conseils en immunologie et surtout en cytométrie ont été très productifs. Je le remercie pour son aide, son soutien et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

J'exprime, avec beaucoup de joie, mes remerciements à tous les membres du laboratoire GRL. Ils m'ont accueillie très cordialement. Certains sont déjà partis, certains sont encore là et des nouveaux sont arrivés. Merci pour la patience avec mon français. Je remercie Laetitia et Marie-Anne. Leur support technique ont été essentiel pour ce travail. Je les remercie aussi pour leur amitié. Je remercie Alex pour les très précieuses discussions et pour son amitié. Je remercie Sam pour son aide pratique au cours de ces 4 années. Je remercie Anne Florin et Sième pour leur soutien. Je pense à Nicolas, à Tchou, à Nadira.....ils ne sont plus là, mais resteront très chers pour moi. Je remercie Sylvie pour son aide, son efficacité et son sourire.

Je remercie très sincèrement tous ceux qui ont soutenu financièrement ce travail : l'association ARAMIS, l'association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) et la Société Française d'Hématologie.

Je remercie Brigitte PEYRUSSE pour son énorme soutien technique qui a permis de donner beaucoup de couleurs à ce travail.

Je souhaite remercier le Professeur Stéfan NONCHEV pour son soutien très présent, ainsi que le Docteur Karin SADOUL pour nos diverses discussions toujours très enrichissantes.

Je souhaite remercier la communauté Adventiste du Septième Jour de Grenoble. Au cours de ces années son soutien a été indispensable. Un grand, grand merci à Stéphanie, à la famille Paita, à Xavier, à Alywin. Je remercie Eugenio pour la force et le courage qu'il m'a apporté pendant un moment très difficile. Je remercie Daniel et Evelyn pour leur sourire. Merci à tous les jeunes et les moins jeunes...

Je remercie ma famille brésilienne. Même en étant loin, son soutien et son amour ont été toujours très proches. Je remercie ma famille française pour son écoute et pour son soutien.

Je voudrais remercier ma cousine Raquel. Elle est arrivée dans un moment très important pour moi. Elle m'a aidée et surtout elle a préparé des délicieux plats ! Ai Ra ! tive uma idéia... !

Je remercie mon époux Guillaume. Il m'a surtout aimé.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	8
I. LES LYMPHOCYTES	8
1. Différenciation et maturation des lymphocytes B normaux.....	8
1.1. Phase antigène indépendante	9
1.2. Phase antigène dépendante	12
2. Recombinaison des gènes du BCR et mécanisme de translocation chromosomique	13
2.1. Organisation du locus V(D)J	14
2.2. La Recombinaison V(D)J	15
2.3. Les mutations somatiques	19
2.4. La commutation de classe	20
2.5. La transposition – mécanisme des translocations ?	21
2.6. Erreurs de recombinaison	21
3. Origine cellulaire des lymphomes B	22
3.1. Les Lymphomes Malins Non Hodgkiniens (LMNH)	25
4. Conclusions	34
II. FAMILLE DES RECEPTEURS POUR LE FRAGMENT Fc DES IgG (FcγR)	35
1. Généralités sur les récepteurs Fc γ	35
2. Organisation génomique et expression tissulaire	37
2.1. Les récepteurs Fc γ RI	38
2.2. Les récepteurs Fc γ RII	39
2.3. Les récepteurs Fc γ RIII	43
2.4. Les récepteurs Fc γ RIV	44
3. Fonctions cellulaires des récepteurs Fc γ R	45
3.1. Fc γ RIIB, le récepteur Fc γ R à motif ITIM.....	47
3.2. Les récepteurs Fc γ R à motif ITAM	62
4. Récepteurs Fc γ et applications thérapeutiques	66
5. Conclusions	68
III. MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE OU APOPTOSE	70
1. Généralités sur l'apoptose	70

1.1. Définition	70
1.2. Rôles de l'apoptose.....	72
1.3. Description de l'apoptose.....	72
1.4. Les principaux effecteurs de l'apoptose.....	76
1.5. Voies des signalisations de l'apoptose	91
2. Protéines de stress et apoptose	102
2.1. Généralité sur les protéines de stress.....	102
2.2. Principales Hsps impliquées dans l'apoptose	103
3. Conclusions	107
OBJECTIFS DU TRAVAIL	109
MATERIEL ET METHODES	110
I. CELLULES	110
1. Lignées Cellulaires	110
2. Cultures	110
3. Congélation.....	111
4. Décongélation.....	111
II. CYTOMETRIE EN FLUX	111
1. Analyses des cellules	112
1.1. Marquage direct	112
1.2. Marquage indirect	112
2. Etude de la mort cellulaire Fc γ RIIB-dépendante.....	113
2.1. Homoagrégation des récepteurs Fc γ RIIB	113
2.2. Externalisation des phosphatidylsérines	114
2.3. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$	114
2.4. Détection de la fragmentation de l'ADN	115
III. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	116
1. Etude de la mort cellulaire Fc γ RIIB-dépendante.....	116
1.1. Etude de la morphologie cellulaire	116
IV. WESTERN BLOT	117
1. Etude de la mort cellulaire Fc γ RIIB-dépendante.....	117
1.1. Extraction protéique et Western Blot.....	117
1.2. Etude de la phosphorylation du récepteur Fc γ RIIB après homoagrégation	118
2. Etude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB.....	120
2.1. Co-recrutement des récepteurs Fc γ RIIB et BCR	120

2.2. Etude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB par Western Blot	120
V. TRANSFECTIONS	121
1. Préparation des clones stables.....	121
RESULTATS	123
1. ARTICLE : FcγRIIB INDUCES CELL DEATH IN HUMAN B LYMPHOMA CELLS.....	123
1. Objectifs.....	124
2. Résultats.....	124
3. Conclusions	125
ABSTRACT.....	127
INTRODUCTION	127
MATERIEL AND METHODS	129
RESULTS	134
DISCUSSION	140
II. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	156
1. Etude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593	157
1.1. Expression membranaire des récepteurs Fc γ RIIB et BCR.	157
1.2. Etude de l'état de la phosphorylation des protéines totales et de l'état d'activation de voies BCR-dépendantes	159
1.3. Etude de l'état de phosphorylation de Fc γ RIIB après recrutement avec le BCR	162
2. Modèles cellulaires exprimant les isoformes de Fc γ RIIB – Lignée BA/F3.....	163
2.1. Analyse de l'expression du récepteur Fc γ RIIB dans les clones	163
2.2. Etude des réponses cellulaires au cours du recrutement du récepteur Fc γ RIIB.....	165
DISCUSSION	167
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175
ANNEXES	199
I. TABLE DES ILLUSTRATIONS	199
II. TABLE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	201

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES LYMPHOCYTES

Les lymphocytes sont des cellules fondamentales dans le système immunitaire. Bien que les lymphocytes aient été reconnus comme un composant cellulaire majeur du sang depuis longtemps, leur rôle central dans l'immunité a été démontré à la fin des années 1950 seulement (Gowans, et al., 1965). Ils sont divisés selon le rôle fonctionnel en trois catégories cellulaires : Les cellules B, les cellules T et les cellules tueuses naturelles ou NK (natural killer). La cellule B différenciée dans les tissus sécrète des anticorps responsables de l'immunité humorale. Les cellules T sont responsables de l'immunité cellulaire ainsi que les cellules NK. Dans la première partie de ce travail nous nous focaliserons sur la lymphopoïèse des lymphocytes B, ainsi que sur les mécanismes génétiques impliqués dans la lymphomagenèse B.

1. Différenciation et maturation des lymphocytes B normaux

La lymphopoïèse B peut être divisée en deux parties. La première est considérée comme phase antigène indépendante qui s'effectue dans la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules B matures en passant par différents types cellulaires (Figure 1) marqués par des étapes successives des réarrangements des gènes d'immunoglobulines, appelées recombinaison V(D)J. Ce processus permet l'expression d'un récepteur spécifique de la cellule B mature, le BCR. Le BCR est constitué des deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques unies de façon covalente par les ponts disulfures. Les protéines Ig α (CD79a) et Ig β (CD79b) font partie de la structure du BCR permettant la transduction du signal intracellulaire. A ce stade, les cellules B matures quittent la moelle osseuse pour gagner les organes lymphoïdes périphériques où elles subissent les dernières étapes de maturation. Cette deuxième partie considérée comme dépendante de l'antigène conduisant aux cellules produisant des immunoglobulines ou aux lymphocytes B mémoires a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Les processus de commutation de classe et hypermutation somatique contribuent à la diversité du répertoire B.

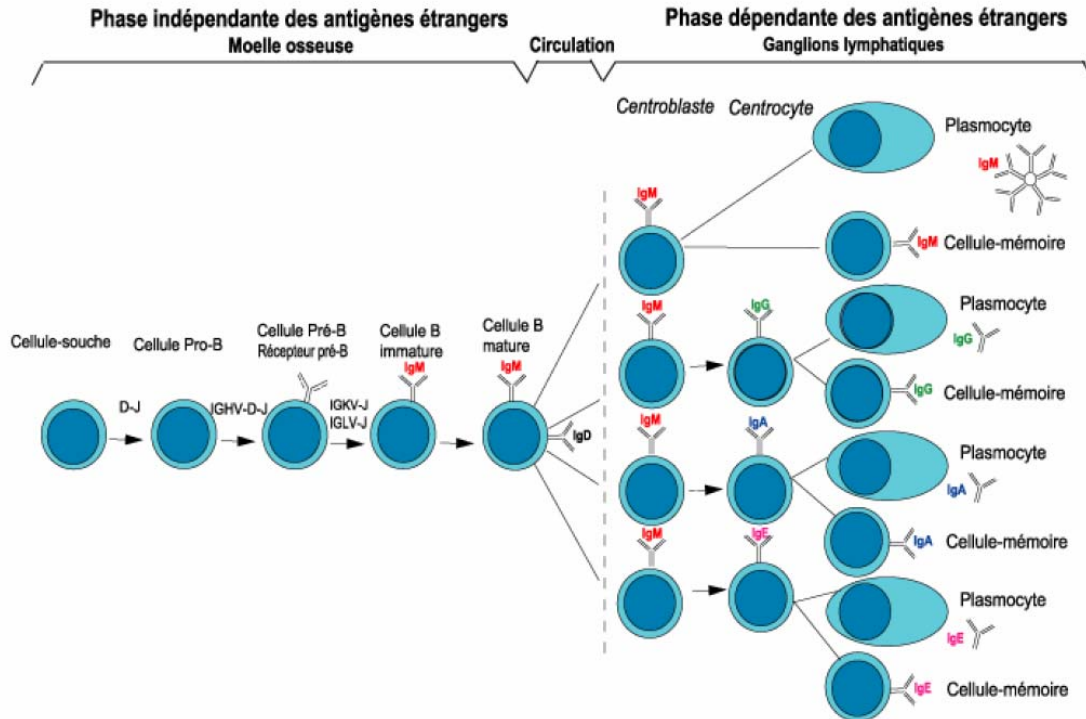


Figure 1. Différenciation des lymphocytes B. D'après Lefranc M.-P. et Lefranc G., IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®, <http://imgt.cines.fr>, Montpellier, France, 2002.

1.1. Phase antigène indépendante

Les cellules pro-B sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et elles possèdent une capacité limitée d'auto-renouvellement. A ce stade, le réarrangement du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines se met en place : la jonction DH à JH au stade précoce de la cellule pro-B est suivie par la jonction VH à DJH au stade tardif de la cellule pro-B. Les cellules pro-B sont caractérisées par l'expression membranaire des antigènes CD19 et CD10. La molécule CD19 qui apparaît à partir de ce stade est un marqueur Pan-B, en revanche, l'expression du CD10 est transitoire et s'éteint après cette étape. Les protéines de transduction du signal intracellulaire, $Ig\alpha$ (CD79a) et $Ig\beta$ (CD79b), sont exprimées faiblement à la surface des cellules pro-B en association avec la calnexine (Nagata et al., 1997). Les cellules pro-B expriment à leur surface une 'pseudo chaîne légère', composée des polypeptides Vpré-B et $\lambda 5$ (lamda-like chez l'homme) (Karasuyama et al., 1993) et elles expriment également une enzyme nucléaire TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) qui ajoute des nucléotides à la jonction

des segments réarrangés, augmentant ainsi leur diversité, et des protéines RAG-1 et RAG-2 (Recombinaison Activating Genes) qui interviennent dans la recombinaison spécifique des gènes des immunoglobulines (Oettinger et al., 1990). Le réarrangement productif du gène de la chaîne lourde μ définit le stade suivant, les lymphocytes pré-B. La chaîne μ dans les grandes cellules pré-B est exprimée à l'intérieur de la cellule et peut-être à sa surface en petites quantités, en combinaison avec la pseudo chaîne légère, et avec les protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$, pour former le récepteur de la cellule pré-B (pré-BCR). Le pré-BCR joue un rôle crucial dans le développement des cellules B. Son expression à la surface permet à la cellule de passer au stade ultérieur de la différenciation (Melchers et al., 1993). Le stade des petites cellules pré-B est marqué par le commencement du réarrangement de la chaîne légère et la réexpression des gènes RAG. Le stade des cellules B immatures est caractérisé par la production d'une chaîne légère classique qui remplace la pseudo chaîne légère et donne naissance à une IgM de surface qui confère à la cellule une spécificité donnée de reconnaissance de l'antigène. Avant que les cellules B immatures ne quittent la moelle osseuse, une sélection négative se réalise : les cellules B immatures possédant les Ig membranaires qui reconnaissent les antigènes du soi avec une grande affinité, sont éliminées par apoptose. Il est possible pour ces cellules de réaliser de réarrangements secondaires au locus de chaînes légères et ainsi de changer la spécificité de leurs récepteurs. Ce phénomène est nommé 'Receptor editing' (Figure 2A) (Tiegs et al., 1993, Dorner et al., 1998). Après avoir subi cette sélection négative, les cellules B immatures quittent la moelle osseuse pour gagner les organes lymphoïdes périphériques où elles subissent les dernières étapes de maturation (Osmond, 1991).

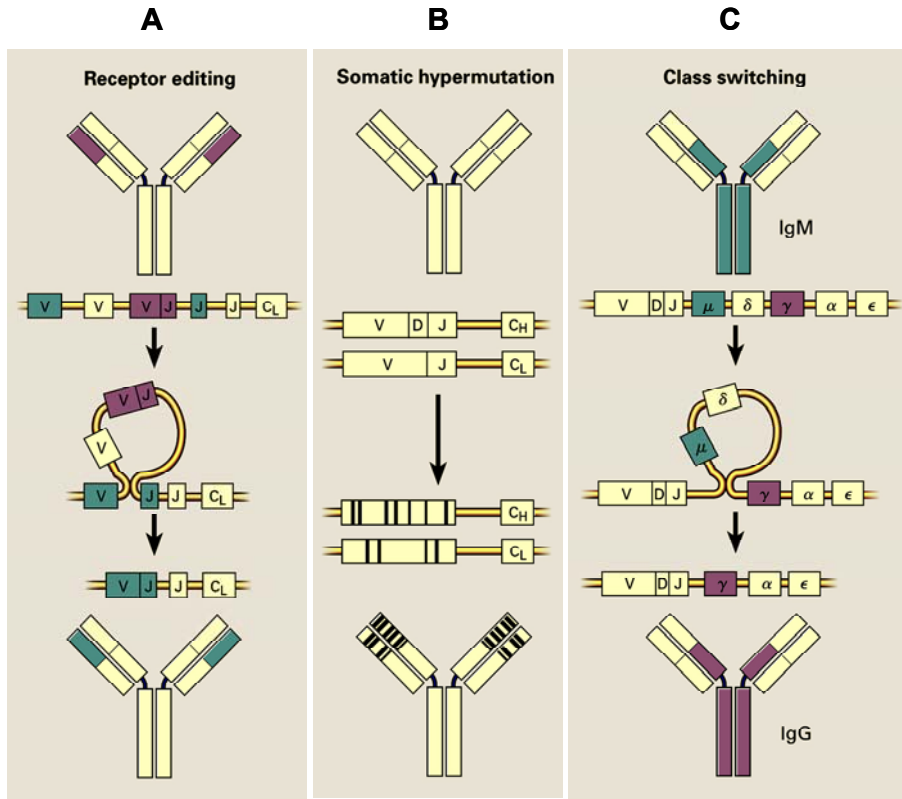


Figure 2. Processus moléculaire de réarrangements des gènes d'immunoglobuline.

(A) « Receptor Editing ». La chaîne légère est remplacée par une autre chaîne permettant le changement de spécificité du récepteur. (B) Hypermutation somatique. Introduction aléatoire et progressive de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes codant les immunoglobulines. (C) Commutation de classe ou 'class switching'. La chaîne lourde exprimé est remplacée par une autre et aboutit à l'expression d'anticorps d'isotype IgG, IgA ou IgE au lieu d'isotype IgM et IgD sans altération de la spécificité pour antigène. D'après Küppers et al., 1999.

1.2. Phase antigène dépendante

Les cellules B immatures survivant à la périphérie continuent leur différenciation pour devenir des cellules B matures qui expriment en surface IgM et IgD. Les cellules qui n'expriment pas d'Ig fonctionnelle sont éliminées par apoptose (Osmond, 1993). Ces lymphocytes B matures (appelés aussi naïfs) transitent par les voies sanguine et lymphatique et colonisent les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires. Quand ces cellules rencontrent l'antigène reconnu par l'immunoglobuline membranaire, elles sont activées et peuvent suivre une des trois voies : soit les cellules entrent dans un état non réactif (anergie) ; soit les cellules arrivent à engendrer un centre germinatif formant un follicule secondaire où elles prolifèrent activement et se différencient spécifiquement en cellules mémoires ou en plasmablastes; soit elles se différencient en plasmocytes sécréteurs d'Ig (IgM en majorité) en dehors d'un centre germinatif et sans subir de mutation somatiques des gènes des Ig (Shaffer et al., 2002) (Figure 3).

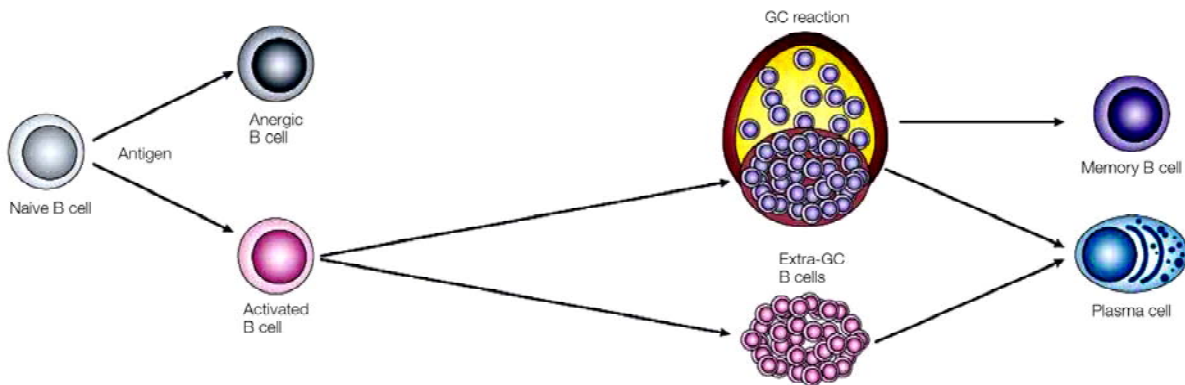


Figure 3. Trois voies possibles quand les cellules B naïves rencontrent l'antigène. D'après Shaffer, et al. 2002.

Par contre, les lymphocytes ne participant pas à la réaction immunologique se placent en périphérie du follicule secondaire et constituent la zone du manteau. Les cellules B matures prolifèrent et deviennent des centroblastes au niveau de la zone sombre du centre germinatif. Ces derniers perdent leurs immunoglobulines de surface, et le processus d'hypermutation somatique (Figure 2B) qui est activé mène à l'introduction aléatoire et progressive de mutations

ponctuelles dans les régions variables des gènes codant les immunoglobulines. Cette étape est capitale dans la maturation d'affinité des anticorps et augmente aussi la diversité du répertoire des lymphocytes B (Klein et al., 1998). A ce même stade, la commutation de classe ou 'class switching' (Figure 2C) se produit et aboutit à l'expression d'anticorps d'isotype IgG, IgA ou IgE au lieu de IgM et IgD sans altération de la spécificité pour antigène (Toellner et al., 1996), avec l'intervention de la protéine AID (activation-induced deaminase) (Kenter, 2003). Par la suite, les centroblastes se transforment en centrocytes qui migrent dans la zone claire du centre germinatif. Les centrocytes expriment de nouveau des Ig de surface (le plus souvent IgG). En effet, la plupart des centrocytes meurent d'apoptose et seulement une petite partie des centrocytes qui arrive à échapper à l'apoptose reçoit un signal de survie provenant d'une reconnaissance d'un antigène présenté par les cellules folliculaires dendritiques et d'une interaction avec les lymphocytes T CD4+ (Defrance et al., 2002). À cette étape, les centrocytes sont également soumis au processus de la commutation de classe et gagnent la partie apicale de la zone claire où ils continuent leur différenciation vers le stade des cellules effectrices : ils se différencient en lymphocytes B mémoires et quittent le centre germinatif pour constituer un pool au niveau de la zone marginale ou ils deviennent les plasmablastes qui terminent leur différenciation en plasmocytes dans la moelle osseuse. Le plasmocyte représente le produit final du développement de la cellule B, où les immunoglobulines membranaires ne sont plus exprimées, toutes les ressources de la cellule étant mobilisées dans la sécrétion des anticorps. Alternativement, certains centrocytes peuvent retourner dans le centre germinatif après avoir cheminé dans la zone externe, et subissent un nouveau cycle en se retransformant en centroblastes (Casamayor-Palleja et al., 1996).

2. Recombinaison des gènes du BCR et mécanisme de translocation chromosomique

La recombinaison des gènes d'immunoglobulines est le seul mécanisme de recombinaison site-spécifique connu chez les eucaryotes supérieurs. Ce mécanisme repose sur la reconnaissance / coupure de sites spécifiques de l'ADN double brin par les recombinases RAG1/2 et ligation de l'ADN réarrangé par des complexes protéiques. C'est le même mécanisme que celui impliqué dans la réparation de l'ADN suite aux radiations ionisantes ou stress génotoxique (la protéine kinase dépendante de l'ADN, DNA-PK et le facteur Ku, l'ADN ligase IV, Artemis, la protéine

XRCC4, probablement l'implication du variant d'histone H2AX et le complexe Mre11/Rad50/Nbs1).

La réparation de l'ADN au niveau de la jonction des segments génère des imprécisions nucléotidiques locales augmentant la diversité des immunoglobulines produites (Schatz et al., 1992). La multiplicité des différents segments des gènes IG, la combinaison des chaînes lourdes et légères augmentent cette diversité générant un répertoire d'immunoglobulines. Cette diversité permet au système immunitaire de répondre à de nombreux agents pathogènes ou autres.

2.1. Organisation du locus V(D)J

Chez l'homme, les gènes d'immunoglobulines sont situés dans le chromosome 14 (14q32) pour le locus de la chaîne H (lourde), le chromosome 2 (2p12) pour le locus de la chaîne k des chaînes L (légères), et le chromosome 22 (22q11) pour le locus de la chaîne λ des chaînes L. Ces gènes sont organisés en clusters comprenant des copies multiples des segments V (variable), J (jonction) et D (diversité) et la région des gènes constants C. Les gènes codant pour les IgL ne possèdent pas de segment D. Les réarrangements géniques des chaînes H s'effectuent en premier. Deux recombinaisons sont nécessaires : la première assemblant les segments DH et JH et la seconde assemblant le segment combiné DJ au segment VH. Les réarrangements géniques des chaînes L s'effectuent plus tard et une seule recombinaison survient entre les segments VL et JL (Figure 4). La recombinaison V(D)J produit un gène fonctionnel qui est transcrit, les réarrangements improductifs étant éliminés.

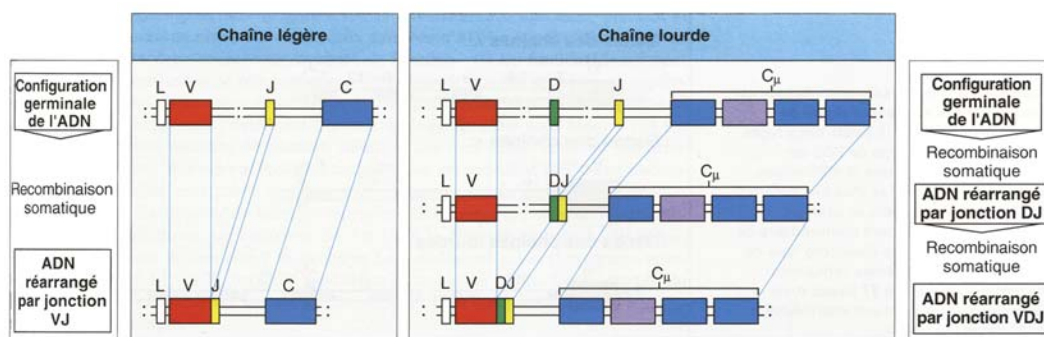


Figure 4. Organisation du locus V(D)J. D'après Parham, 2000.

2.2. La Recombinaison V(D)J

La recombinaison des segments V, J et D est dirigée par des séquences appelées RSS (Recombination Signal Sequence) adjacentes à chaque segment V, D et J. Les séquences RSS sont constituées d'un monamère (9 nucléotides) et un heptamère (7 nucléotides) séparées par un segment intermédiaire de 12 ou 23pb (Figure 5A). La recombinaison a lieu uniquement au niveau de séquences RSS contenant des segments intermédiaires différents de 12 et 23 pb (Tonegawa, 1983) et nécessite la coupure de 2 RSS pour produire une jonction fonctionnelle entre deux segments. Les séquences RSS sont coupées de façon précise et forment des bouts francs au niveau des séquences heptamères alors que la coupure au niveau des segments codants aboutit à une structure en épingle à cheveux qui va générer des imprécisions nucléotidiques (délétion ou insertion nucléotidique) par la suite.

Au niveau des segments codants on retrouve deux types d'insertion nucléotidique: i) les insertions « Non-templated » où jusqu'à 15 nucléotides (N) sont ajoutés par la terminal déoxynucléotide transférase TdT au niveau des joints codants. Cette insertion est spécifique du stade précoce du développement du lymphocyte B, stade où la TdT est exprimée et où a lieu la recombinaison V(D)J. La TdT ajoute ces nucléotides sans amorçage, avec une préférence pour des résidus G. Ces régions N sont ainsi riches en G-C. ii) les insertions « templated » où quelques nucléotides sont ajoutés au niveau des joints codants. Ces nucléotides (P, palindromique) sont complémentaires de l'extrémité du joint codant à proximité de la séquence RSS. Cette insertion provient d'une coupure non symétrique de la structure en épingle à cheveux par les recombinaisons, générant des simples brins de quelques nucléotides de long. Suite à l'insertion des nucléotides P, des bouts francs sont formés et la ligation a lieu. La coordination de la coupure et de la réparation permettrait d'éviter les coupures uniques qui ne pourraient être recombinaisonnées et laisseraient donc une cassure double brin dans l'ADN.

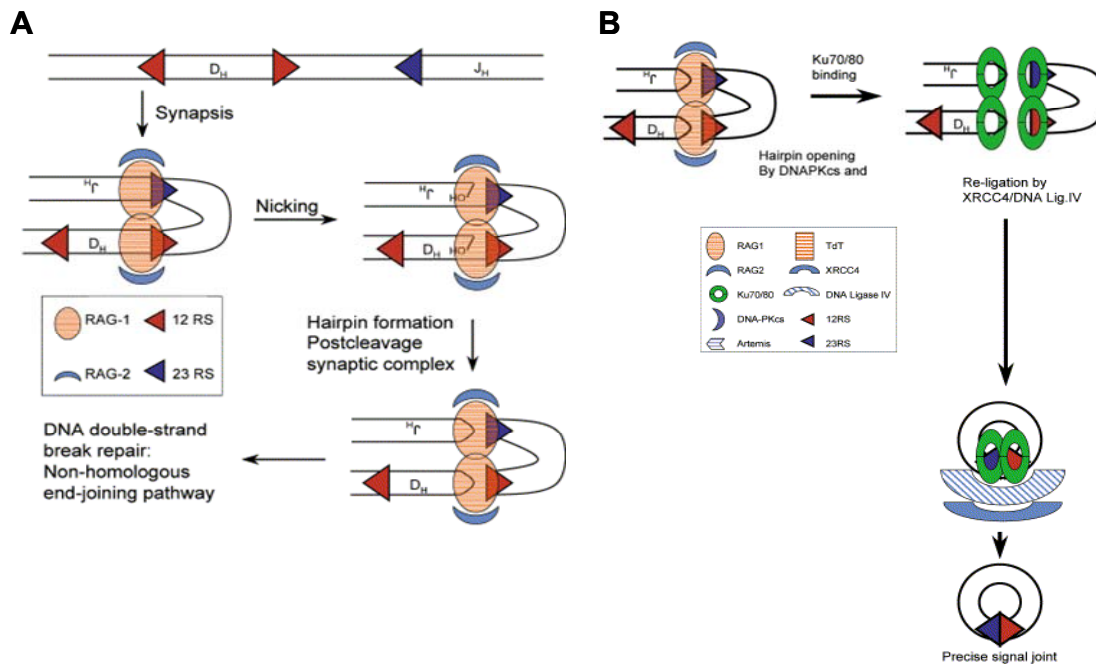


Figure 5. Schéma de la recombinaison V(D)J chez les mammifères.

(A) Clivage des séquences RSS par les recombinases RAG1 et RAG2. Les recombinases clivent l'ADN au niveau de 2 séquences RSS contenant des séquences espaceurs différents et forment un complexe post-clivage qui va être réparé par le mécanisme NHEJ.

(B) Recombinaison V(D)J et réparation par le mécanisme NHEJ. Le mécanisme NHEJ permet la ligation des segments codants au cours de l'étape finale de recombinaison. Les différents acteurs du mécanisme NHEJ sont représentés. Cette étape aboutit à la formation d'une jonction entre un segment D et un segment J dans cet exemple. D'après Jung, D et al., 2004.

2.2.1. Les recombinases RAG1 et RAG2

Les recombinases RAG 1 et 2 sont les seuls facteurs lymphoïdes nécessaires à la recombinaison V(D)J. Ces endonucléases permettent le clivage de la séquence RSS, l'ouverture de la structure en épingle à cheveux et la jonction des segments codants au cours de la recombinaison. Des souris invalidées par knock-out pour les gènes RAG ne peuvent plus recombiner les gènes d'immunoglobulines et ne produisent plus de lymphocytes B matures ou de cellules T (Mombaerts et al., 1992) ; (Shinkai et al., 1992). Les gènes RAG sont très conservés (parmi le xénope, le poulet, la souris et l'homme, à l'exception du zebrafish et la truite, possédant des introns) et leur expression est nécessaire à la recombinaison. Le locus

RAG présente une structure particulière. Les gènes *RAG* sont très proches, transcrits de façon convergente et ne possèdent pas d'introns. Cette structure rappelle la structure d'un transposon (pour revue, Gellert, 2002). Les recombinases sont capables d'effectuer la transposition sur un mode conservatif. Ce mécanisme de transposition est similaire à celui de la transposase et distinct de la recombinaison V(D)J.

2.2.2. Réparation de l'ADN au cours de la recombinaison V(D)J

Suite au clivage, les recombinases restent associées avec les segments codants et forment un complexe post clivage permettant la ligation des segments codants par le mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining) (Figure 5B).

Les propriétés fonctionnelles exactes de ce mécanisme restent à éclaircir. Les connaissances actuelles de ce mécanisme proviennent d'études biochimiques de la ligation des segments codants (hors contexte de la recombinaison) et de l'étude de la recombinaison V(D)J in vivo chez des souris déficientes pour NHEJ (pour revue, Roth, Zhu et al. 1993). Les études réalisées ont montré que les dernières étapes de la recombinaison V(D)J nécessitent différents facteurs de réparation des cassures double brin de l'ADN, le complexe protéine kinase dépendante de l'ADN ou DNA-PK, le complexe ADN ligase IV/XRCC4 (Xray Cross Complementing Group 4) (Critchlow et al., 1997), l'endonucléase ARTEMIS, le variant d'histone H2AX phosphorylé et le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 (Paull et al., 2000).

Le complexe DNA-PK est composé de la sous-unité catalytique DNA-PKCS et de l'hétérodimère Ku. La sous-unité DNA-PK est une sérine/thréonine kinase dépendante de l'ADN impliquée dans la détection des lésions de l'ADN. Cette enzyme fait partie de la famille PIKK (Phosphatidyl Inositol-3-Kinase related protein Kinase) incluant les protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3 related). Cette kinase est capable d'auto phosphorylation et possède de nombreux substrats comme Ku70, Ku80 et XRCC4. La phosphorylation de ces substrats participe à la régulation de la réparation des cassures double brin (pour revue, Lees-Miller et Meek 2003). Les souris mutées pour cette enzyme sont immunodéficientes car bloquées pour la recombinaison V(D)J. L'hétérodimère Ku (Ku70/Ku80) lie l'ADN coupé double brin ou l'ADN simple brin et les structures en épingles à cheveux. Ku aide à la liaison du complexe ADN ligase IV/ XRCC4 au niveau des bouts francs.

2.2.3. Contrôle de la recombinaison VDJ

La recombinaison V(D)J peut être régulée de façon tissu-spécifique puisque les recombinases sont exprimées uniquement dans les cellules lymphoïdes, et de façon temporelle une fois que les recombinases sont exprimées au stade où a lieu la recombinaison. Ce contrôle s'exerce de deux façons : par le contrôle de l'expression des recombinases et par l'accessibilité des séquences RSS pour la recombinaison.

Contrôle par les recombinases

L'expression spécifique des recombinases en fonction du type cellulaire (cellules lymphoïdes), du stade de différenciation des lymphocytes et d'un ordre temporel assure le contrôle de la recombinaison V(D). La chaîne lourde est réarrangée avant la chaîne légère, la chaîne kappa avant lambda, avec exclusion de tout allèle réarrangé de manière improductive. Les recombinases RAG1 et RAG2 sont exprimées uniquement dans les cellules lymphoïdes lors de la recombinaison V(D)J. RAG1 et RAG2 présentent un pic d'expression en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Desiderio, 1995). Le niveau de protéine RAG2 est contrôlé par la phosphorylation de la tyrosine-490, par la cycline cdc2, permettant la dégradation de RAG2 (Lin and Desiderio 1993). Ceci suggère un contrôle de la quantité de protéine présente en fonction du cycle cellulaire (Lin et Desiderio 1993) et pourrait expliquer le fait que la recombinaison V(D)J ait lieu lors de la phase G1 (Lin et Desiderio 1995 ; Schlissel et al., 1993).

Contrôle par l'accessibilité des séquences RSS – hypothèse

Une autre voie de contrôle est assurée par l'accessibilité des séquences RSS. En effet seule une petite fraction des séquences RSS est accessible en fonction du type cellulaire (B ou T) et du type de locus (pour les cellules B, IGH puis IGL, pour le TCR, locus β avant le locus α) effectuant la recombinaison. Ceci a permis de formuler une hypothèse pour le contrôle de la recombinaison V(D)J :

Les séquences RSS sont bloquées par un état chromatinien, des protéines se liant aux RSS ou des modifications de l'ADN rendant la séquence RSS inaccessible. Ces séquences doivent être

activement ouvertes pour la recombinaison. Il existe probablement des mécanismes contrôlant et/ou régulant l'accessibilité de ces séquences pour permettre la recombinaison V(D)J.

Il a été montré qu'un des éléments communs pour la recombinaison est l'ouverture de l'élément enhancer (Sleckman et al., 1996). L'acétylation / déacétylation des histones semble jouer un rôle important dans le contrôle de l'accessibilité. Des études réalisées chez la souris ont montré que l'acétylation du locus TCR augmente de façon parallèle à la recombinaison V(D)J (McMurry et Krangel 2000). Cette acétylation semble précéder la recombinaison (McBlane et Boyes 2000). Des facteurs de remodelage de la chromatine semblent impliqués dans le clivage de l'ADN au cours de la recombinaison. En effet, dans des modèles de recombinaison in vitro, l'ajout du facteur de remodelage SWI/SNF et d'histones hyperacétylées permet le clivage d'une séquence RSS (Kwon et al., 2000). Les recombinases RAG semblent elles aussi impliquer des facteurs ayant une activité sur la chromatine ou un état chromatinien spécifique pour permettre la recombinaison (Patenge et al., 2004).

Suite à la recombinaison V(D)J, les lymphocytes B quittent la moelle osseuse et subissent deux autres processus de diversification des immunoglobulines produites au niveau du centre germinatif dans les organes lymphoïdes secondaires : les mutations somatiques, initiées par la rencontre avec l'antigène, introduisant des mutations ponctuelles au niveau de la région variable des Igs et la commutation de classe qui va interchanger la partie constante de l'Ig générant une Ig de même spécificité mais de fonction différente. Ces deux processus sont brièvement discutés.

2.3. Les mutations somatiques

Le répertoire des immunoglobulines est accru au cours de la réponse immune par accumulation de mutations somatiques dans les régions variables des gènes IGH et IGL. Ces événements surviennent à un taux de 1/1000 pb/cycle au sein des centres germinatifs des follicules lymphoïdes. Ils se produisent dans une zone de 1,5 kb en aval du promoteur et les études sur souris transgéniques ont montré que transcription et mutations somatiques étaient étroitement liées (Storb et al., 1998).

Le processus de mutation somatique fait appel à la protéine AID (Activation Induced cytidine Deaminase), homologue de la cytidine déaminase APOBEC impliquée dans l'editing

(Muramatsu et al., 1999). AID est exprimé dans le centre germinatif où ont lieu les mutations somatiques et la commutation de classe. Des souris déficientes pour AID se développent normalement mais ne peuvent effectuer ni les mutations somatiques ni la commutation de classe. De plus l'expression constitutive forcée d'AID dans des cellules murines induit le développement de lymphomes T (Okazaki et al., 2003).

AID déamine une Cytidine en Uracile générant un mésappariement U :G. Ce mésappariement est pris en charge par le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MSH2, MSH6, Exo1 et UNG) en association avec une ADN polymérase introduisant des erreurs. Ce processus aboutit à l'introduction de mutation ponctuelle dans la région variable V (pour revue, Honjo et al., 2004).

2.4. La commutation de classe

La commutation d'isotype au niveau du locus IGH implique des signaux de recombinaison spécifiques, les séquences S (switch), situées en 5' de chaque gène constant de la chaîne lourde (sauf C δ , exprimé par épissage alternatif). Cette commutation de classe se produit dans les lymphocytes matures (exprimant une Ig de surface de type IgM ou IgMD) en contact avec un antigène dans le centre germinatif des follicules lymphoïdes. Elle conduit à la juxtaposition d'un gène constant C μ , C γ ou C ϵ à un gène V(D)J fonctionnel pour produire des anticorps de même spécificité antigénique mais avec des fonctions effectrices spécialisées. Contrairement à la recombinaison V(D)J, la commutation de classe est spécifique d'une région. Elle a lieu dans les introns et n'influence pas le cadre de lecture. Les régions S (Switch) sont composées de la répétition en tandem d'un pentamère (GAGCT et GGGGT) ou d'une séquence de 49pb (Stavnezer 1996). La commutation de classe est largement contrôlée par les cellules T, différentes cytokines et les interactions CD40-CD40 ligand (Vanasse et al., 1999). Cette recombinaison n'est pas initiée par RAG-1 et -2, mais les étapes finales de rapprochement des extrémités et de ligation utilisent la même voie que la recombinaison V(D)J, à savoir le complexe DNA-PK (Manis et al., 2002). Ce processus fait aussi appel à l'enzyme AID dans les premières étapes de la commutation de classe (pour revue, Honjo et al., 2004). AID induit par un mécanisme potentiel d'editing-ARN la production d'une recombinase. Cette recombinase génère des cassures doubles brins dans la région S qui sont ensuite prises en charge et réparées par le système NHEJ.

2.5. La transposition – mécanisme des translocations ?

Les recombinaisons peuvent cliver l'ADN, générer des structures en épingle à cheveux et des bouts francs avec un 3'OH capable d'attaquer un double brin. L'extrémité 3'OH peut attaquer l'ADN double brin d'un autre chromosome. Ce transfert de brin par transposition va générer une extrémité 3'OH sur le chromosome partenaire. Cette extrémité 3'OH attaque le brin complémentaire pour former une structure en épingle à cheveux et une jonction inter chromosomique RSS-séquence ADN. Les 2 structures en épingle à cheveu portées par 2 chromosomes différents peuvent se lier et aboutissent à une translocation réciproque entre les 2 chromosomes. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de certaines translocations impliquant les gènes d'immunoglobuline.

2.6. Erreurs de recombinaison

Le système V(D)J est un exemple rare de réarrangement somatique programmé, mais il est de par son fonctionnement même, un processus infidèle, mettant en jeu des mécanismes de tolérance aux lésions de l'ADN. Environ 40% des jonctions codantes sont improductives car ne possédant pas de cadre de lecture ouvert (Danska et Gaidos 1997, Kirsch et Lista 1997). Ces erreurs ne se confinent pas aux seuls réarrangements intragéniques T ou B. En effet, certaines translocations comme la t(14;18) se produisent occasionnellement dans les tissus lymphoïdes d'individus tout à fait sains (Limpens et al., 1995). Il a également été suggéré la possibilité de réarrangements interchromosomiques faisant intervenir les recombinaisons par un mécanisme de transposition. La transposition par les recombinaisons pourrait générer des translocations chromosomiques par un mécanisme différent de la recombinaison VDJ. Ces translocations lieraient une séquence RSS du locus V(D)J à un site non RSS sur un chromosome partenaire différent. La ligation ferait intervenir le système de réparation double brin NEHJ.

De nombreux exemples de translocations chromosomiques impliquant les séquences RSS ont été rapportés dans les hémopathies malignes. Les translocations sont initiées par le clivage V(D)J suggérant un rôle pathogénique de la recombinaison V(D)J. Les sites de cassure dans les gènes IGH corréleraient avec les sites de recombinaison physiologiques. On retrouve la présence de séquences heptamères / nonamères ou additions nucléotidiques (Tsujiimoto et al., 1985,

Tycko et Sklar 1990) au niveau des points de cassure, certains cas de lymphomes malins avec une cassure VH pourraient témoigner de la genèse des translocations à l'occasion des cassures survenant au cours des mutations somatiques (Goossens et al., 1998). Les séquences S détectées au voisinage des points de cassure de certaines translocations chromosomiques, « dateraient » ipso facto la translocation, après la recombinaison V(D)J, pendant la commutation de classe.

De façon générale, l'intense activité d'expansion clonale retrouvée dans le centre germinatif associée aux cassures au niveau de l'ADN comme la commutation de classe, la mutation somatique ainsi que le 'receptor editing' représente un risque pour la tumorigenèse B. Toutes ces cassures peuvent faire l'objet d'erreurs dans leur réparation et conduire à la genèse de translocations, d'où leur fréquence dans les hémopathies lymphoïdes malignes.

3. Origine cellulaire des lymphomes B

Les lymphomes B se présentent sous la forme d'un clone de cellules malignes bloquées à un stade de maturation. Les erreurs dans le réarrangement des gènes d'immunoglobulines aboutissent à des translocations chromosomiques. Ces anomalies génétiques sont souvent la cause de la transformation maligne des cellules normales, elles sont suivies des mécanismes permettent la prolifération cellulaire non régulée et de l'échappement à l'immunosurveillance.

Pour bien identifier l'origine de ces lymphomes B, on peut les distinguer en phase « pré-centre germinatif », phase « centre germinatif » et phase « post-centre germinatif ». En effet, la présence des mutations des gènes des régions variables d'Ig après le passage dans le centre germinatif, nous permet de caractériser ces hémopathies lymphoïdes B (Figures 6, 7).

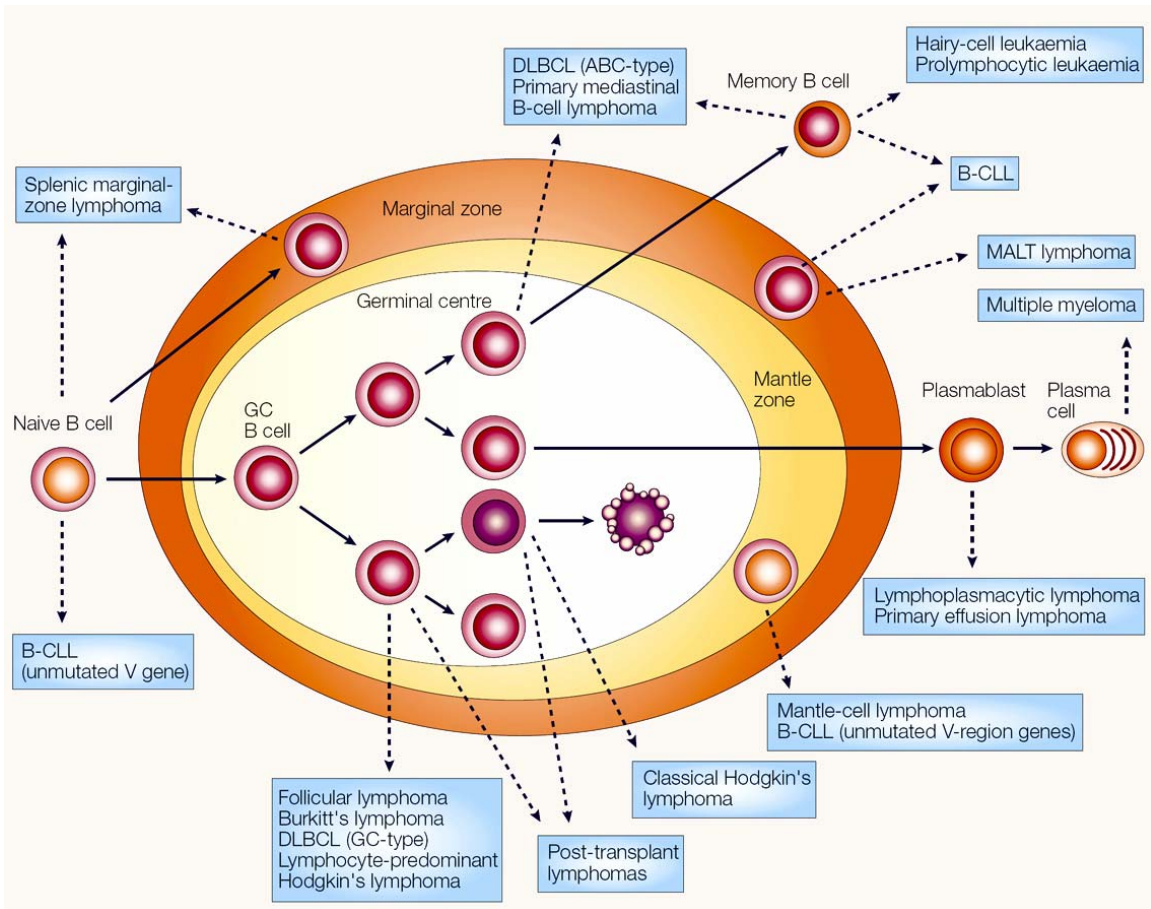


Figure 6. Correspondance entre les cellules B normales et les différents syndromes lymphoprolifératifs. D'après Küppers 2005.

Human mature B-cell lymphomas

Lymphoma	Features	Frequency among lymphomas (%)*	Proposed cellular origin
B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)	Leukaemia of small B cells that express the CD5 antigen, involving peripheral-blood and bone-marrow cells. Common in elderly patients. Called 'small lymphocytic lymphoma' when lymph-node cells are predominantly involved. Patients with leukaemia cells that lack variable (V)-region gene mutations have a worse prognosis than patients with mutations in V-region genes.	7	Memory B cell? Naive B cell? Marginal-zone B cell?
Mantle-cell lymphoma	Lymphoma arises from cells that populate the mantle zone of follicles, express CD5 and show aberration in cyclin-D1 expression. Nearly all cases are associated with <i>BCL1-IgH</i> translocation.	5	CD5 ⁺ mantle-zone B cell
B-cell prolymphocytic leukaemia	Chronic B-cell malignancy related to B-CLL. Over 50% of cancer cells represent prolymphocytes (large lymphocytes with clumped chromatin and prominent nucleolus).	<1	Memory B cell
Follicular lymphoma	A nodal lymphoma with a follicular growth pattern. Lymphoma cells morphologically and phenotypically resemble GC B cells. Most cases are associated with <i>BCL2-IgH</i> translocation.	20	GC B cell
Hairy-cell leukaemia	Chronic B-cell malignancy involving spleen and bone marrow. Very few circulating leukaemia cells. Tumour cells form 'hairy' projections.	<1	Memory B cell
MALT lymphoma	Extranodal marginal-zone B-cell lymphoma. Develops mostly in acquired lymphoid structures.	7	Marginal-zone B cell
Nodal marginal-zone lymphoma	Lymphoma with primary presentation in lymph nodes. Lymphoma cells resemble marginal-zone or monocytoid B cells, but often have heterogenous cytology, which ranges from small to large lymphocytes and includes plasma cells.	2	Marginal-zone B cell? Monocytoid B cell?
Splenic marginal-zone lymphoma	Micronodular lymphoid infiltration in the splenic white pulp. Mostly small IgD ⁺ lymphoma cells that replace normal follicles and the marginal-zone region. Frequently involves infiltration into bone marrow and circulation.	1	Subset of naive B cells that have partially differentiated into marginal-zone B cells?
Burkitt's lymphoma	Fast growing. Mostly extranodal. Characterized by a <i>MYC-Ig</i> translocation. Patients with endemic form are EBV-positive in nearly all cases. Patients with sporadic form are EBV-positive in about 30% of cases.	2	GC B cell
Diffuse large B-cell lymphoma	Heterogenous group of lymphomas characterized by large B cells. Several subtypes are recognized. Morphological variants include centroblasts and immunoblasts.	30–40	GC or post-GC B cell
Primary mediastinal B-cell lymphoma	Subtype of diffuse large B-cell lymphoma located in the mediastinum. Tumour cells are large B cells but also show a number of similarities to Reed–Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma. Most frequently occurs in young women.	2	Thymic B cell
Post-transplant lymphoma	Mostly of the diffuse large-cell lymphoma type. Lymphomas that arise in patients after organ transplantation. Immunosuppressive treatment confers risk of uncontrolled proliferation of EBV-infected B cells that can develop into lymphomas.	<1	GC B cell
Primary effusion lymphoma	Frequently occurs in patients with AIDS or patients who have received organ transplants. Lymphoma cells are found as effusions in serous cavities, such as pleura, pericardium or peritoneum.	<0.5	(Post) GC B cell
Lymphoplasmacytic lymphoma	Involves lymph nodes, bone marrow and spleen. The tumour-cell population is composed of small B cells, plasmacytoid lymphocytes and plasma cells. Most patients present with a serum monoclonal protein, usually of the IgM type.	1	(Post) GC B cell
Multiple myeloma	Neoplastic proliferation of plasma cells in the bone marrow.	10	Plasma cell
Classical Hodgkin's lymphoma	Characterized by bizarre, large tumour cells. Hodgkin and Reed–Sternberg cells account for less than 1% of cells in the tumour, and are admixed with various non-neoplastic cell types. Tumour cells show a phenotype not characteristic of any normal haematopoietic cell type.	10	Defective GC B cell
Lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma	Rare indolent subtype of Hodgkin's lymphoma. Lymphoma cells show a B-cell phenotype, represent a small population in the tissue, and grow in association with follicular dendritic cells and T-helper cells. Good prognosis.	0.5	GC B cell

*These numbers refer to the frequencies in Europe and North America. AIDS, acquired immune deficiency syndrome; EBV, Epstein–Barr virus; Ig, immunoglobulin; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; GC, germinal centre.

Figure 7. Origine, caractère et fréquence des lymphomes de type B. D'après Küppers 2005.

3.1. Les Lymphomes Malins Non Hodgkiniens (LMNH)

Les Lymphomes Malins Non Hodgkiniens (LMNH) constituent, ainsi un ensemble hétérogène de tumeurs du tissu lymphoïde. Leur diversité est le reflet de la variété des fonctions de la cellule lymphocytaire normale et de la complexité des phénomènes de sa maturation.

3.1.1. Données Epidémiologiques

L'incidence de Lymphomes Malins Non-Hodgkiniens (LMNH) augmente régulièrement depuis plus de 30 ans. Environ 20 nouveaux cas par 100 000 habitants sont enregistrés par an dans le pays occidentaux (Fisher et Fischer, 2004). Les LMNH sont le cinquième type de cancer aux États-Unis, avec approximativement 55 000 nouveau cas par an (Jemal et al., 2005). En France, l'incidence des LMNH a été multipliée par deux et demi entre 1978 et 2002. Environ 95% des lymphomes sont du type B et les deux plus fréquents sont les lymphomes B à grandes cellules et les lymphomes folliculaires. Les données du Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) montrent que les LMNH sont plus fréquents chez l'homme que chez la femme avec un rapport homme/femme compris entre 1,3 et 2 et les taux les plus faibles sont observés dans les pays en voie de développement (www.iarc.fr). Parallèlement, une augmentation de mortalité est observée dans presque tous les pays du monde, reflétant l'augmentation très importante de l'incidence en l'absence de thérapeutiques suffisantes. Le vieillissement de la population peut aussi rendre compte de cette augmentation. Plus de la moitié des lymphomes non Hodgkiniens surviennent, en effet, après 60 ou 65 ans et leur incidence est proche de 50/100 000 au-delà de 70 ans (Kreuter, 2005).

3.1.2. Classification des LMNH de type B

Etant donné l'hétérogénéité des hémopathies lymphoïdes, une classification appropriée est devenue nécessaire. Les méthodes de classifications classiques, tels la Working Formulation (USA, 1982) ou le système de Kiel (Europe, 1988 et 1992), basées principalement sur des critères histologiques et cytologiques, manquaient de flexibilité et menaient parfois à l'amalgame de certaines entités pathologiques distinctes. Les classifications plus récentes, celles de REAL (Revised European American lymphoma) (Harris et al., 1994) et de WHO (World Health

Organization) (WHO classification of tumours. Lyon : IARC Press, 2001) font intégrer non seulement des critères histologiques et cytologiques, mais aussi des données immunologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire. La classification de WHO 2001 est actuellement la seule classification des lymphomes reposant sur un consensus international (Figure 8). Cette classification est une évolution de la classification de REAL tenant compte des données physiopathologiques nouvelles, concernant en particulier les dérégulations génétiques induites par les aberrations chromosomiques.

L'étude cytogénétique et moléculaire prend aujourd'hui une part importante dans l'exploration des lymphomes, compte tenu des progrès qu'elle permet dans la connaissance des mécanismes de développement de ces tumeurs, de la valeur diagnostique de ces anomalies et de leurs implications pronostiques. Cependant, cette classification risque d'évoluer grâce aux nouvelles avancées dans les dernières années par l'étude du profil d'expression de gènes dans la biologie des hémopathies malignes. La caractérisation des profils d'expression génique par l'étude simultanée d'un très grand nombre de gènes met à jour de nouvelles données sur le comportement clinique des LMNH. Les connaissances sur la physiopathologie de ces tumeurs (lymphomagenèse, progression tumorale, gènes cibles) ainsi que sur les mécanismes moléculaires participant à la sensibilité thérapeutique devraient révéler de nouvelles cibles thérapeutiques (pour revue Davis et al., 2002 ; Staudt et Dave 2005).

Table 1

Entities of the WHO classification for lymphoid neoplasms (2001) and their equivalents in the updated Kiel classification (1992) and the REAL classification (1994). *Provisional entities* of the REAL classification are printed in *italics*. Major differences between the WHO and the REAL classification, as described in the text, are underlined with colour. By accident, diffuse large B-cell lymphoma and intravascular large B-cell lymphoma are given the same code-number (9680/3) in the original literature [8]. This mistake has been reported to one of the editors of the WHO book.

Kiel (updated) 1992	REAL 1994	WHO 2001	ICD-O code
B-cell lymphomas	B-cell neoplasms	B-cell neoplasms	
	Precursor B-cell neoplasm	Precursor B-cell neoplasm	
Acute lymphoblastic B-cell leukaemia B lymphoblastic lymphoma	Precursor B lymphoblastic leukaemia / lymphoma	Precursor B lymphoblastic leukaemia / lymphoma	9835 / 3 9728 / 3
	Peripheral B-cell neoplasms	Mature B-cell neoplasms	
B-cell chronic lymphocytic leukaemia Immunocytoma, lymphoplasmacytoid type	B-cell chronic lymphocytic leukaemia / small lymphocytic lymphoma /	Chronic lymphocytic leukaemia / small lymphocytic lymphoma	9823 / 3 9670 / 3
B-cell prolymphocytic leukaemia Immunocytoma, lymphoplasmacytic type	B-cell prolymphocytic leukaemia Lymphoplasmacytoid lymphoma / immunocytoma	B-cell prolymphocytic leukaemia Lymphoplasmacytic lymphoma	9833 / 3 9671 / 3
Hairy cell leukaemia	<i>Splenic marginal zone lymphoma</i> (± villous lymphocytes)	Splenic marginal zone lymphoma (± villous lymphocytes)	9689 / 3
Plasmacytic lymphoma (Plasmacytoma)	Hairy cell leukaemia Plasmacytoma / Plasma cell myeloma	Hairy cell leukaemia Plasma cell neoplasms Plasma cell myeloma Solitary plasmacytoma of bone Extravascular plasmacytoma	9940 / 3 9732 / 3 9731 / 3 9734 / 3
	Marginal zone B-cell lymphoma, extranodal (MALT-type ± monocytoid B cells)	Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699 / 3
Monocytoid B-cell lymphoma	<i>Marginal zone B-cell lymphoma, nodal</i> (± monocytoid B cells)	Nodal marginal zone B-cell lymphoma (± monocytoid cells)	9699 / 3
	Follicle centre lymphoma, follicular	Follicular lymphoma	9690 / 3
Centroblastic-centrocytic lymphoma, follicular, follicular and diffuse – with an increased number of centroblasts	<i>Grade I</i> <i>Grade II</i> <i>Grade III</i>	Grade 1 Grade 2 Grade 3a Grade 3b	
Centroblastic lymphoma, follicular	<i>Grade III</i>		
Centroblastic-centrocytic lymphoma, diffuse	<i>Follicle centre lymphoma, diffuse, small cell</i>	Diffuse follicle centre lymphoma	
Centrocytic (mantle cell) lymphoma	Mantle cell lymphoma	Mantle cell lymphoma	9673 / 3
Centroblastic lymphoma, centrocytoid			
Centroblastic lymphoma, diffuse B immunoblastic lymphoma B-cell large anaplastic lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma (variants) centroblastic immunoblastic anaplastic T-cell / histiocyte rich plasmablastic with expression of full length ALK (IgA+)	9680 / 3
	DLBCL subtype: Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	9679 / 3
Angio-endotheliotropic (intravascular) lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	Intravascular large B-cell lymphoma	9680 / 3
	Diffuse large B-cell lymphoma	Primary effusion lymphoma	9678 / 3
Burkitt lymphoma (BL)	Burkitt's lymphoma	Burkitt lymphoma	9687 / 3
BL with intracytoplasmic immunoglobulin	<i>DLBCL subtype:</i> <i>High-grade B-cell lymphoma, Burkitt-like</i>	BL with plasmacytoid differentiation atypical BL / Burkitt-like	
	Burkitt leukaemia	Burkitt leukaemia	9826 / 3
		B-cell proliferations of uncertain malignant potential	
Lymphomatoid granulomatosis (Liebow)		Lymphomatoid granulomatosis	9766 / 1
		Post-transplant lymphoproliferative disorder, polymorphic	9970 / 1

Figure 8. Les classifications des lymphomes B Kiel, REAL et WHO. D'après Cogliatti SB et Schmid U, Swiss Med Wkly 2002.

3.1.3. Mécanismes de la lymphomagenèse des LMNH

Les translocations chromosomiques qui impliquent le locus de l'immunoglobuline (*IG*) sont les marques de beaucoup de types de lymphome B. Cependant, d'autres facteurs ont révélé des rôles importants dans la pathogenèse des lymphomes B. C'est le cas de l'expression du BCR. La plupart des lymphomes B dépendent de son expression pour la survie. L'activation antigénique du BCR semble être un facteur important dans lymphomagenèse. Un autre concept récemment évalué est le rôle du microenvironnement dans le développement tumoral. Ces trois mécanismes seront brièvement discutés.

Translocations chromosomiques

Les translocations chromosomiques qui impliquent le locus de l'immunoglobuline (*IG*) sont les marques de beaucoup de types de lymphome B. Ces anomalies génétiques mettent en jeu les gènes d'immunoglobulines (*IGH* en 14q32, *IGκ* en 2p12 et *IGL* en 22q11) en les juxtaposant à un oncogène : *BCL2* en 18q21, *CCND1* en 11q13, *MYC* en 8q24. Elles résultent d'erreurs des mécanismes de recombinaison génétique mis en jeu lors de la différenciation lymphoïde et seraient alors des événements de survenue précoce dans la genèse de ces tumeurs. Ces anomalies peuvent survenir tôt dans le développement de la maladie, mais aussi lors de la transformation d'un bas grade à un haut grade de malignité. La plupart de ces translocations ont été clonées, le site de cassure dans les gènes Ig localisé et les protooncogènes associés identifiés (Tableau 1). Willis et al ont résumé le rôle des translocations impliquant les gènes d'Ig (Willis et Dyer, 2000).

Translocations	Gènes impliqués	Pathologie tumorale
t(1 ;14)(p22 ;q32)	<i>BCL10</i>	MALT
t(1 ;14)(p21 ;q32)	<i>BCL9</i>	DLCL
t(1 ;14)(p21 ;q32)	<i>MUM2/3</i>	MM
t(1 ;14)(p42 ;q32)	?	Lymphomes B
t(2 ;14)(p13 ;q32)	<i>BCL11A</i>	CLL
t(3 ;14)(p21 ;q32)	?	Lymphomes B
t(3 ;14)(p27 ;q32)	<i>LAZ3/BCL6</i>	DLCL
t(4 ;14)(p16 ;q32)	<i>FGFR3</i>	Myélomes
t(5 ;14)(p31 ;q32)	<i>IL5</i>	LAL
t(6 ;14)(p25 ;q32)	<i>IRF4</i>	Myélomes
t(7 ;14)(p21 ;q32)	<i>CDK6</i>	SLVL
t(8 ;14)(p11 ;q32)	?	LAL
t(8 ;14)(p24 ;q32)	<i>MYC</i>	Burkitt, LAL
t(9 ;14)(p13 ;q32)	<i>PAX5</i>	LPL
t(10 ;14)(p24 ;q32)	<i>NFKB2</i>	Lymphomes B
t(11 ;14)(p13 ;q32)	<i>CCND1</i>	MCL, LC
t(11 ;14)(p23 ;q32)	<i>RCK/LPC</i>	Lymphomes B
t(11 ;14)(p23 ;q32)	<i>PAFAH2</i>	Lymphomes B
t(12 ;14)(p24 ;q32)	<i>BCL7A</i>	Lymphomes B
t(11 ;14)(p23 ;q32)	<i>RCK/LPC</i>	Lymphomes B
t(14 ;14)(p11 ;q32)	<i>TCL1</i>	Lymphomes T, LC T
t(14 ;15)(q32 ;q12)	<i>BCL8</i>	DLCL
t(14 ;16)(q32 ;q23)	<i>C-MAF</i>	Myélomes
t(14 ;18)(q32 ;q21)	<i>BCL2</i>	FL
t(14 ;19)(q32 ;q13)	<i>BCL3</i>	CLL
t(14 ;22)(q32 ;q11)	?	LAL, LC

Tableau 1 : Principales translocations récurrentes impliquant le locus IGH. D'après Mitelman et al, 1997 et Willis et Dyer, 2000.

Certaines translocations définissent des entités clinico-biologiques au sein des lymphomes malins, comme la t(14;18)(q32;q21) et les lymphomes folliculaires, ou la t(11;14)(q13;q32) et les lymphomes à cellules du manteau. Cette association « spécifique » d'une translocation chromosomique avec une maladie doit cependant être nuancée. Une anomalie peut, en fonction du contexte chromosomique de la cellule, être considérée comme primaire et entité-spécifique ou comme secondaire. L'exemple typique est la t(8;14)(q13;q32). Isolée, elle signe le lymphome de Burkitt ; associée à une t(14;18)(q32;q21) ou une t(11;14)(q13;q32), elle prend valeur d'anomalie secondaire et accompagne la transformation histologique d'un lymphome de bas grade vers un lymphome de haut grade de malignité. Elle peut même se révéler d'emblée dans

un tableau bruyant de leucémie aiguë lymphoblastique chimiorésistante associée à une t(14;18) (Thangavelu et al., 1990). Il en est ainsi pour la majorité des translocations ou anomalies

a) Translocation t(14;18)(q32;q21)- BCL2

Modèle du lymphome folliculaire

Environ 85% des lymphomes folliculaires sont associés à une t(14;18)(q32;q21), entraînant la juxtaposition du gène BCL2 en 18q21.3 avec les gènes IGH. Les points de cassure sur IGH se produisent tous dans la partie JH, alors que les points de cassure sur le chromosome 18 sont répartis sur plusieurs clusters dans la région 3' du gène. 50% surviennent au niveau d'une région de 150 pb dans la partie 3'UTR du gène (major break point région), 25% se situent dans une région mineure (minor cluster région), les autres se répartissant dans une région intermédiaire située entre les 2 premiers clusters. Quelques points de cassures ont lieu au niveau de la partie 5' non codante du gène, ces cas sont principalement décrits dans les Leucémies Lymphoïde Chronique de type B (LLC-B) et concernent majoritairement le locus IGL (Willis et Dyer, 2000).

La translocation conduit à la dérégulation de l'expression de BCL2. BCL2 est une protéine impliquée dans le contrôle de l'apoptose (Chao et Korsmeyer 1998 ; Cory et Adams 2002). BCL2 maintient l'intégrité de la membrane mitochondriale en bloquant la libération d'activateurs apoptotiques comme le cytochrome c (Kluck et al., 1997) empêchant ainsi l'activation des caspases et donc l'apoptose. BCL2 régule également la progression dans le cycle cellulaire en favorisant le passage des cellules en G0 (Vairo et al., 1996). L'analyse de souris BCL2^{-/-} a montré que l'hématopoïèse est normale avec cependant une incapacité à maintenir l'homéostasie de la population lymphocytaire. Ces souris meurent au bout de quelques mois suite à des malformations rénales (Ranger et al., 2001).

La surexpression de BCL2, permet la survie en l'absence de facteur de croissance de lignées cellulaires dépendantes en cytokines telles que l'IL3, l'IL4 ou le GM-CSF. BCL2 protège également les lymphocytes contre l'apoptose induite par les radiations, par les glucocorticoïdes ou le pontage du CD3 dans les lymphocytes T (Chao et Korsmeyer 1998).

Le rôle oncogénique de BCL2 a été mis en évidence dans des modèles murins transgéniques où BCL2 est surexprimé dans les lymphocytes T ou lymphocytes B. Les souris surexprimant BCL2 présentent une hyperplasie des follicules spléniques et développent des lymphomes B à grandes cellules, d'évolution très rapide. On a pu démontrer l'activation secondaire de MYC par

translocation chromosomique dans ces tumeurs (McDonnell et al., 1989 ; McDonnell et Korsmeyer, 1991).

La dérégulation de BCL2 est également un facteur de chimiorésistance. L'hyper-expression de BCL2 rend les tumeurs réfractaires à de nombreuses drogues in vitro et in vivo (Sartorius et Krammer 2002 ; Schmitt et al., 2000).

L'analyse transcriptome des profils d'expression génique a permis de mettre en évidence une « signature d'expression » propre aux différents types de lymphomes. Ainsi les LLC et LM folliculaires ont un profil différent des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLCL, Diffuse large B-cell lymphoma) mais présentent un profil semblable (pour les gènes dont l'expression est modifiée au cours du cycle cellulaire) aux lymphocytes B normaux au repos. Cette similitude peut être mise en relation avec le caractère peu proliférant de ces deux types de lymphomes. D'autre part, les LM folliculaires présentent une signature caractéristique des cellules du centre germinatif (pour les gènes BCL6, A-myb, CD10, CD138) (Alizadeh et al., 2000), confirmant l'origine de ces cellules tumorales. L'équipe de Freedman met cependant en évidence des différences d'expression entre les cellules de LM folliculaires et les cellules des centres germinatifs « normaux » (Husson et al., 2002) en particulier la surexpression de certains gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, le contrôle de la lymphopoïèse B et les interactions cellulaires, parallèlement, à la baisse d'expression de gènes impliqués dans l'adhésion. De façon intéressante, la plupart de ces gènes sont localisés dans des régions chromosomiques fréquemment réarrangées dans les lymphomes folliculaires.

Ces études mettent donc en évidence des profils transcriptionnels spécifiques des différents sous-types de lymphomes. Ce type d'approche permettra par la suite de définir et de mieux comprendre la physiopathologie de ces tumeurs (progression tumorale, gènes impliqués).

Rôle du récepteur de la cellule B, le BCR

Le lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) se développe fréquemment en association avec *Helicobacter pilori*. L'observation de l'éradication de l'agent pathogène, dans certains cas, entraîne la disparition de la maladie. Cette éradication et le fait que la plupart des lymphomes B expriment l'immunoglobuline de surface (Figure 9) suggèrent une dépendance des cellules tumorales à l'expression du BCR. Ces indices sont appuyés par les études de Vaandrager et al montrant que les translocations au niveau du locus d'IG ciblent l'allèle non fonctionnel, laissant intact le BCR (Vaandrager et al., 1998). De plus, le traitement de

patients atteints de lymphome folliculaire avec l'anticorps anti-idiotypique n'induit pas l'émergence de cellules de lymphomes avec un phénotype BCR négatif (Küppers, 2005). De cette façon, il est possible de conclure que les signaux de survie déclenchée par le BCR dans une cellule B normale peuvent également promouvoir la survie des cellules lymphomateuses B.

The B-cell-receptor dependency of human B-cell lymphomas

Different types of B-cell lymphoma express different levels of B-cell receptor (BCR), or BCRs with different specificities or levels or activity. Listed below are the details of BCR function in these various cancer types.

Lymphomas that express BCR

- Mantle-cell lymphoma.
- Diffuse large B-cell lymphoma.
- Splenic marginal-zone lymphoma.
- Lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma.
- Hairy-cell leukaemia.
- Prolymphocytic leukaemia.
- Burkitt's lymphoma.
- Lymphoplasmacytic lymphoma.

Lymphomas associated with BCR expression and indication for antigen activation

- Follicular lymphomas arise and grow in the germinal centre and in some patient samples the BCR is autoreactive. The BCR variable domain contains mutations that promote carbohydrate modification.
- Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas are in many cases associated with autoreactive BCR, particularly with rheumatoid factors.
- B-cell chronic lymphocytic leukaemia has a restricted variable (V)-region gene repertoire and the BCR is often autoreactive. A BCR specific to human T-cell lymphotropic virus 1 has been identified in patients who are infected with this virus.
- In hepatitis C virus (HCV)-associated lymphomas, HCV-specificity of BCR has been reported in some cases. Disease regression occurs after antiviral therapy.
- In primary central nervous system lymphomas, about half the cases express the same heavy-chain (V_H) gene segment (VH4-34), whereas other genes of the BCR are diverse, indicating tumour-cell stimulation by superantigen binding to the BCR.

Lymphomas that do not express BCR

- Classical Hodgkin's lymphomas are associated with inactivating immunoglobulin (Ig) V-region gene mutations in at least 25% of cases. Transcription factors that promote BCR expression are downregulated. A transcriptionally inactive chromatin structure is seen in these lymphomas.
- In post-transplant lymphomas, inactivating V-region gene mutations are observed in at least 10–20% of cases.
- Primary effusion lymphomas are not associated with inactivating Ig V-region gene mutations. However, downregulation of transcription factors that promote BCR expression is seen.
- Primary mediastinal B-cell lymphomas are not associated with inactivating Ig V-region gene mutations. Expression of transcription factors that regulate BCR expression is seen, but internal Ig enhancer activity is downregulated.

Figure 9. Dépendance des lymphomes B à l'expression du BCR. D'après Küppers, 2005

Rôle du microenvironnement du centre germinatif

Dans plusieurs types de lymphomes le microenvironnement tumoral semble être important dans la survie et/ou la prolifération des cellules tumorales. Dans le lymphome folliculaire, les cellules de la tumeur sont retrouvées dans des structures folliculaires en étroite association avec des cellules T auxiliaires et des cellules dendritiques, comme dans un centre germinatif normal. Il semblerait que les cellules lymphomateuses nécessitent des interactions cellulaires au niveau du centre germinatif (Figure 10). En effet, une étude a montré que les cellules issues d'un lymphome folliculaire sont capables de proliférer lorsqu'elles sont mises en culture avec des lymphocytes T CD4+ ou encore en présence de l'anticorps anti CD40, l'activation du CD40 étant un signal principal de survie pour les cellules B du centre germinatif. (Küppers, 2005). La notion de microenvironnement dans la pathogenèse des lymphomes a été récemment appuyée par l'étude de Dave et al. Leur étude sur le profil d'expression de gènes dans le but d'identifier de facteurs pronostics de survie a permis clairement de mettre en évidence que la signature pronostic est représentée par les gènes exprimés par les cellules T, les macrophages ainsi que par les cellules dendritiques (Dave et al., 2004). La compréhension de l'influence du microenvironnement dans la biologie des lymphomes folliculaires ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la thérapeutique.

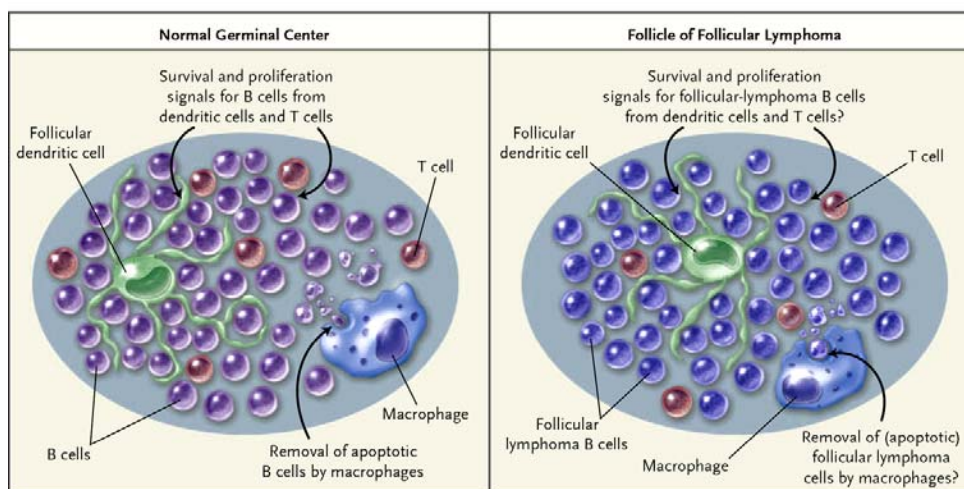


Figure 10. Interactions cellulaires dans le centre germinatif. D'après Küppers, 2004

4. Conclusions

Tout au long de la vie, les cellules B sont produites à partir de cellules souches dans la moelle osseuse. Les différentes étapes dans la maturation des cellules B correspondent aux changements moléculaires qui accompagnent les réarrangements géniques nécessaires à la production des chaînes lourdes et légères. Celles-ci aboutiront à l'expression de l'immunoglobuline membranaire, avant que la cellule B rencontre son antigène. Les phases de la différenciation qui dépendent de l'antigène correspondent aux changements, soit de la structure, soit dans l'expression des gènes d'immunoglobuline due aux réarrangements de l'ADN (lors de la commutation de classe ou de mutations somatiques). Ces modifications dans la structure de l'ADN peuvent induire des erreurs conduisant à des anomalies chromosomiques, des translocations lors de réarrangements. Elles sont les principaux acteurs de la lymphomagenèse. L'expression du BCR ainsi que le microenvironnement de la tumeur jouent un rôle important dans la transformation maligne. Dans la plupart des translocations chromosomiques les gènes d'immunoglobuline sont retrouvés à côté des gènes qui contrôlent la division (cyclin D1), la prolifération (c-myc), la différenciation (bcl-6, PAX5) et la survie (bcl-2, NF-kappaB) cellulaire. Dans tous les cas ces translocations se traduisent par une altération de l'expression du gène cible et ont pour conséquence un déséquilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose (mort cellulaire programmée abordée dans le chapitre III de ce travail). La plupart de ces gènes sont normalement régulés par les signaux provenant du BCR. L'activation antigénique de la cellule par le BCR ainsi que les signaux activateurs du microenvironnement de la tumeur favorisent la prolifération maligne.

Dans ce contexte, nous pouvons imaginer qu'un contrôle négatif au niveau des fonctions activatrices BCR-dépendante pourrait moduler la croissance tumorale par le rétablissement de l'équilibre entre la survie et la mort. La cellule B est capable de contrôler ses fonctions cellulaires d'activation par l'intermédiaire du récepteur Fc γ RIIB. Celui-ci est capable de reconnaître le fragment Fc des immunoglobulines et participer ainsi au contrôle de réponses cellulaires. Fc γ RIIB appartient à la famille des récepteurs pour le fragment Fc des IgG et fait l'objet de la deuxième partie de ce travail.

II. FAMILLE DES RECEPTEURS POUR LE FRAGMENT Fc DES IgG (Fc γ R)

1. Généralités sur les récepteurs Fc γ

Bien que les récepteurs cellulaires pour immunoglobulines fussent identifiés, il y a plus de 35 ans, avec l'observation de la fixation de globules rouges opsonisés par des immunoglobulines G (IgG) sur des macrophages, leur rôle central dans la réponse immune fut découvert seulement dans la dernière décennie. Ils possèdent des rôles clés dans les phases afférentes et efférentes de la réponse immune par leur capacité à moduler l'activation cellulaire B induite par les complexes immuns, la maturation des cellules dendritiques, ainsi qu'à déclencher des réponses effectrices telles que la phagocytose du macrophage, la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) des cellules tueuses naturelles (natural killer), et l'activation et le recrutement des cellules inflammatoires. De plus, en raison de la présence concomitante des récepteurs activateurs et inhibiteurs dans la même cellule, ils sont devenus un paradigme pour étudier la balance de signaux positifs et négatifs qui finalement déterminent l'aboutissement de la réponse immune. Dans cette partie de ce travail nous nous focaliseront sur la biologie de récepteurs Fc γ (Fc γ R) en mettant l'accent sur le représentant inhibiteur de cette famille, le Fc γ RIIB.

Dans toute espèce étudiée jusqu'à présent, quatre différentes classes de récepteurs Fc γ ont été définies: les récepteurs Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), et Fc γ RIV. Alors que les récepteurs Fc γ RI présentent une haute affinité et une spécificité restreinte à l'isotype du fragment constant (Fc) des immunoglobulines G, Fc γ RII et Fc γ RIII présentent une basse affinité pour la région Fc d'IgG sans spécificité pour l'isotype (Ravetch et Kinet, 1991 ; Hulett et Hogarth, 1994), et Fc γ RIV présente une affinité intermédiaire restreinte seulement à deux sous-classes de l'isotype (IgG2a et IgG2b) (Davis et al., 2002 ; Nimmerjahn et al., 2005).

Les récepteurs pour le fragment Fc des IgG (Fc γ R) sont des glycoprotéines transmembranaires, qui appartiennent à la superfamille des Ig, composées d'une sous-unité alpha de liaison du ligand et d'une chaîne γ de signalisation intracellulaire (Figure 11). Les sous-unités α , constituées de 2 ou 3 domaines d'immunoglobulines, sont hautement conservées dans leurs parties extracellulaires, avec des pourcentages d'homologie de 70 à 98%. Des approches cellulaires et moléculaires dans l'étude de la structure des récepteurs Fc γ et ses ligands ont montrés que le récepteur Fc interagit asymétriquement avec la région Fc des chaînes lourdes de

l'IgG (Figure 12) conduisant à une stœchiométrie de 1:1 entre le ligand et le récepteur (Cohen-Solal et al., 2004). Les récepteurs de haute affinité, Fc γ RI peuvent fixer les IgG monomériques grâce à leurs 3 domaines extracellulaires ($K_a=10^7-10^9 M^{-1}$) alors que les Fc γ RII et Fc γ RIII, récepteurs de faible affinité ($K_A =10^6 M^{-1}$) à 2 domaines extracellulaires, ne peuvent fixer que des complexes immuns ou des agrégats d'immunoglobulines (Daeron, 1997).

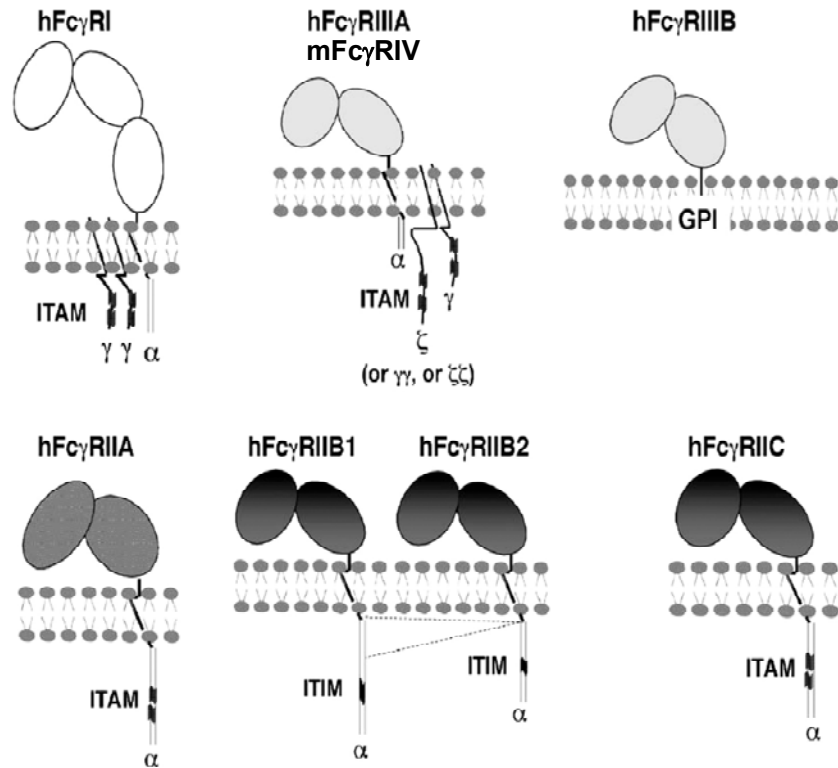


Figure 11. Famille des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (Fc γ R). D'après Sibénil et al., 2006.

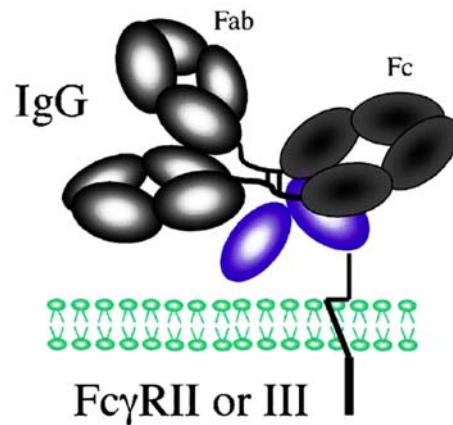


Figure 12. Schéma de l'interaction d'un récepteurs $Fc\gamma$ de faible affinité avec l'IgG. D'après Cohen-Solal et al., 2004

2. Organisation génomique et expression tissulaire

Il existe huit gènes codant pour les récepteurs $Fc\gamma$ chez l'homme. Trois gènes codent pour les récepteurs de haute affinité $Fc\gamma RI$ (*FCGR1A*, *FCGR1B* et *FCGR1C*) et cinq gènes codent pour les récepteurs de basse affinité $Fc\gamma RII$ (*FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*) et $Fc\gamma RIII$ (*FCGR3A* et *FCGR3B*). Les gènes pour les récepteurs de basse affinité sont localisés sur la région 1q23 du chromosome 1 humain. Les gènes pour les récepteurs $Fc\gamma RIA/C$ et B sont localisés en 1q21 et 1p12 respectivement (Figure 13). Le gène *FCGRIV* a été identifié chez la souris et il code pour le récepteur $Fc\gamma RIV$ de basse affinité.

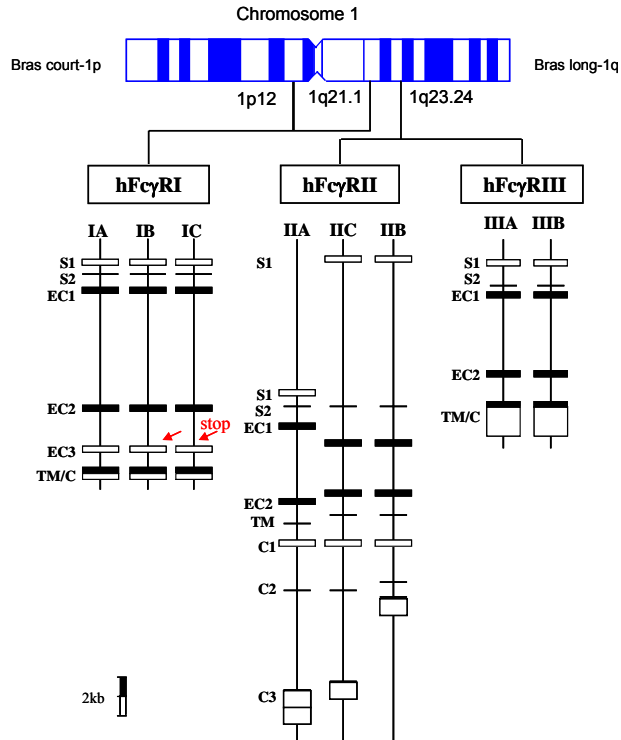


Figure 13. Localisation chromosomique et organisation génomique des gènes codant pour les Fc γ R. Les exons sont représentés par des rectangles, les introns par des lignes pleines. S (peptide signal), EC (domaine extracellulaire), TM (domaine transmembranaire) et C (domaine intra-cytoplasmique). D'après van de Winkel et Capel, 1993

2.1. Les récepteurs Fc γ RI

Trois gènes, *FCGR1A*, *FCGR1B* et *FCGR1C* codent pour 3 récepteurs, hFc γ RIA, hFc γ RIB et hFc γ RIC, fortement homologues (>98%). Une inversion péricentrique décrite par Maresco et al explique leur localisation de part et d'autre du centromère du chromosome 1. *FCGR1B* est situé en 1p12 alors que *FCGR1A* et *FCGR1C* sont localisés en 1q21. (Maresco et al., 1996). Les gènes sont constitués de 6 exons, 2 pour les séquences « signal » (S1 et S2), 3 pour les domaines extracellulaires (EC1, EC2 et EC3) et 1 commun aux parties transmembranaires et intracellulaires (TM/C). Les gènes *FCGR1B* et *C* diffèrent de *FCGR1A* par l'existence d'un codon stop au niveau de l'exon EC3 (Figure 13). Ces gènes codent pour un transcrit majoritaire de 1.7 kb et un transcrit minoritaire de 1.6 kb. Les gènes *FCGR1A* et *FCGR1C* produisent un seul transcrit, alors que *FCGR1B* produit deux transcrits, le transcrit Fc γ RIB1, a « full-length »

transcrit dû à la translation du stop codon dans l'exon EC3, et un transcrit Fc γ RIB2 dont l'exon EC3 est absent.

Les récepteurs Fc γ RIA sont des protéines de 72 kD, constituées d'une partie extracellulaire de 292 acides aminés (aa) avec 3 domaines de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire de 21 aa et une partie intra-cytoplasmique de 101 aa. La présence de 3 domaines extracellulaires est spécifique à ce récepteur et lui confère la capacité de fixer les IgG monovalentes (haute affinité). Les récepteurs Fc γ RIB et Fc γ RIC sont de protéines avec 2 domaines de type immunoglobuline. Le récepteur Fc γ Rib2 est transmembranaire alors que Fc γ Rib1 et Fc γ RIC sont des protéines solubles.

Ce type de récepteur Fc γ RI est présent constitutivement dans les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques (Takai, 2002). Il peut être induit dans les neutrophiles et les éosinophiles par l'INF- γ (van de Winkel et al., 1993) ainsi que dans les monocytes par IL-10 (Sharif et al., 2004)

2.2. Les récepteurs Fc γ RII

Trois gènes sont identifiés, *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* en 1q22, codant pour six isoformes. Les 2 gènes *FCGR2A* et *FCGR2B* (distants d'environ 90 kb) sont orientés dans le même sens transcriptionnel (télomère-centromère). Le gène *FCGR2C* est en position télomérique par rapport aux 2 précédents, à une distance d'environ 70 kb avec une orientation inverse. (Su et al., 2002). Ces gènes sont constitués de 8 exons, 2 pour les séquences signal (S1 et S2), 2 pour les domaines extracellulaires (EC1 et EC2), 1 pour le domaine transmembranaire et 3 pour la partie intracellulaire (C1/C2/C3). Le gène *FCGR2C* résulte d'un échange non équilibré entre les gènes *FCGR2A* et *FCGR2B*. Les exons EC1, EC2, TM et C1 dérivent de *FCGR2B* alors que les 2 exons C2 et C3 proviennent de *FCGR2A*. Le résultat est la formation d'un gène hybride codant pour une protéine de fusion (Figure 13).

Le gène *FCGR2A* (sans équivalent décrit chez la souris) code pour 2 transcrits de 1.8 et 2.5 kb résultant de 2 sites de polyadénylation distants de 1 kb alors que *FCGR2B* et *FCGR2C* n'ont qu'un seul transcrit de 1.6 kb (van de Winkel et Capel, 1993). L'épissage alternatif du gène

FCGR2B produit 3 transcrits, $Fc\gamma RIIb1$, $Fc\gamma RIIb2$ and $Fc\gamma RIIb3$. Les deux isoformes b1 et b2 se différencient par une séquence de 19 acides aminés supplémentaires (sur b1) au niveau de l'exon C1, à proximité du domaine transmembranaire. L'isoforme b3 est identique à l'isoforme b2, mais sans l'information contenu sur l'exon S2 (Brooks et al., 1989).

Il existe pour $Fc\gamma RIIA$ un polymorphisme déterminé par la substitution d'une arginine à la place d'une histidine en position 131 (R131 versus H131). L'allèle $Fc\gamma RIIA-131R$ présente une affinité réduite par les sous classes d'IgG humaine alors que l'allèle $Fc\gamma RII-131H$ présente une très forte affinité pour IgG2 et IgG3. Un deuxième polymorphisme pour $Fc\gamma RIIA$ a été décrit. La mutation de deux nucléotides provoque la substitution de la glutamine par le tryptophane en position 27 dans la région membranaire distale au niveau du domaine de liaison du ligand (van Sorge et al., 2003). Un polymorphisme a été également décrit dans l'exon EC1 de $Fc\gamma RIIC$ qui peut induire un allèle nul expliquant l'absence d'expression parfois décrite sur les cellules NK humaines (Metes et al., 1998).

Le polymorphisme d'un seul nucléotide dans le gène *FCGR2B* substitue l'acide aminé isoleucine par la thréonine en position 232 dans la région transmembranaire (Kuogoku et al., 2002). Floto et al ont décrit que $Fc\gamma RIIB-232T$ est exclu du radeau lipidique et comme conséquence cet allèle est incapable d'inhiber la signalisation de récepteurs activateurs dans la lignée myéloïde U937 (Floto et al., 2005). Un autre polymorphisme également au niveau de la région transmembranaire, a été décrit. La substitution d'une isoleucine à la place d'une thréonine en position 187 résulte en un allèle qui est capable de modifier la signalisation BCR dépendante (Li et al., 2003). Sept autres points de mutations de $Fc\gamma RIIB$ dans le domaine de liaison du ligand ont été décrits (Yasuda et al., 2001). Des polymorphismes au niveau du promoteur du gène *FCGR2B* murin ont été également décrit (Jiang et al., 2000, Pritchard et al., 2000, Xiu et al., 2002). La substitution d'une guanine à la place de la cytosine en position 343 dans le promoteur provoque la diminution de la transcription et ainsi, de l'expression du récepteur $Fc\gamma RIIB$ à la surface cellulaire (Blank et al., 2005). Plus récemment un polymorphisme de délétion a été décrit dans le promoteur du gène *FCGR2B* (Sakai et al., 2006). Les polymorphismes sont souvent associés aux syndromes auto-immuns.

2.2.1. Expression tissulaire

Les récepteurs Fc γ RII sont des protéines de 40 kD, constituées d'une partie extracellulaire de 180 acides aminés (aa) avec 2 domaines de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire de 27-29 aa et une partie intra-cytoplasmique variable de 44-76 aa (van de Winkel et Capel, 1993).

Fc γ RIIA/C

L'analyse par northern-blot et RT-PCR d'un panel de lignées tumorales humaines a montrée la présence des transcrits Fc γ RIIA et/ou Fc γ RIIC dans des lignées myéloïdes (U937), lymphocytaires B (Raji, RPMI1788) et mégacaryocytaires (DAMI, K562, HEL). Les monocytes/macrophages et les lymphocytes B expriment les isoformes IIa1/a2 associées à un plus faible niveau des transcrits IIc, alors que l'on retrouve uniquement des transcrits IIa1/a2 dans la lignée plaquettaire (Cassel et al., 1993). Au niveau moléculaire, Sarmay et al ont montré que les lignées de lymphomes de Burkitt (BL41, Raji, CD46 et ST486) présentent une expression variable des transcrits Fc γ RIIA et que son expression est diminuée dans les cellules B activées soit par la cytokine IL-4 ou par le fragment F(ab) $'_2$ anti-IgM humaine (Sarmay et al., 1995).

Les travaux de Rabinovitch et al sont en accord avec ces résultats. Par cytométrie en flux, cette équipe à montré l'expression de Fc γ RIIA membranaire sur la surface des lignées lymphocytaires B Raji et Ramos, ainsi que dans les cellules B au repos du sang périphérique. De plus, l'expression de ce récepteur activateur est diminuée dans les cellules B activées (Rabinovitch et al., 2004). Le traitement avec IL-4 provoque également une diminution de l'expression des transcrit Fc γ RIIA et de la protéine dans les monocytes purifiés du sang périphérique. Inversement, l'interféron γ (INF- γ) augmente l'expression de Fc γ RIIA (Pricop et al., 2001). Une autre étude par cytométrie en flux a montré l'expression de Fc γ RIIA dans 50% de cas de leucémie lymphoïde chronique B (B-CLL) et contrairement aux travaux de Rabinovitch et al cette étude ne décrit pas l'expression de Fc γ RIIA dans les lymphocytes B du sang périphérique (Gamberale et al., 2005).

L'expression de Fc γ RIIA a été également rapportée dans les neutrophiles humains, étant augmentée par TNF- α et IL-10 (Belostocki et al., 2005). Les cellules NK expriment les transcrits Ilc, avec en particulier 3 isoformes, Fc γ Rc2-4, résultant d'épissages alternatifs (Metes et al., 1998).

Fc γ RIIB

Les transcrits Fc γ RIIB sont principalement retrouvés dans les lymphocytes B et dans des lignées tumorales B. Deux études ont cependant démontré leur expression dans les cellules myéloïdes. Pricop et al ont décrit l'expression de l'isoforme b2 dans la lignée U937, associée à la présence de la protéine dans les monocytes du sang circulant. L'expression de cet isoforme est augmentée en présence d'IL-4 et est diminuée lorsque les monocytes sont cultivés en présence d'INF- γ (Pricop et al., 2001). Les travaux de Tridandapani et al et plus récemment ceux de Joshi et al ont confirmé ces résultats (Tridandapani et al., 2002 ; Joshi et al., 2006). Ces derniers, ont montré en outre que l'induction de l'expression de Fc γ RIIB par IL-4, au niveau moléculaire et protéique, est augmentée de façon synergique par IL-10. Contrairement aux monocytes, les transcrits Fc γ RIIb2 sont diminués dans les cellules B activées par IL-4, et associés à une augmentation de l'isoforme Fc γ RIIb1 ainsi qu'à la diminution de Fc γ RIIA (Sarmay et al., 1995).

L'étude par RT-PCR d'un panel de lignées tumorales B correspondant à différents niveaux de maturation lymphocytaire, montre que l'expression simultanée des transcrits b1 et b2 est restreinte aux lignées B matures (Daudi, Raji, BSM), alors que les lignées au stade plasmocytaire (U266, CRL) n'expriment que l'isoforme b1. De plus, il existe dans les lymphocytes B, une régulation au cours du cycle cellulaire du ratio b1/b2 avec une augmentation sélective de b1 pendant la phase G1, alors qu'au repos c'est l'isoforme b2 qui est exprimée préférentiellement (Sarmay et al., 1995).

Les lignées pré-B testées (Nalm 6, REH, SMS-SB) n'expriment aucun des transcrits Ilb (seulement IIa) (van de Winkel et Capel, 1993). Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire du récepteur sur des lignées lymphocytaires B est en accord avec ces résultats (Mantzioris et al., 1993; Van Den Herik-Oudijk et al., 1994). Une expression moléculaire et protéique faible de Fc γ RIIB a été identifiée dans les cellules B du centre

germinatif purifié à partir des amygdales humaines (Macardle et al., 2002). Parallèlement, chez la souris, à partir de la rate, les cellules B du centre germinatif ont une faible expression de Fc γ RIIB (Rao et al., 2002). La présence de ce récepteur a été également retrouvée en RT-PCR et de cytométrie en flux dans certaines sous-populations T (Mantzioris et al., 1993).

2.3. Les récepteurs Fc γ RIII

Deux gènes sont identifiés, *FCGR3A* et *FCGR3B* (sans équivalent chez la souris), situés sur le bras long du chromosome 1 en 1q22 (Qiu et al., 1990). Le gène *FCGR3A* est intercalé entre les 2 gènes *FCGR2A* et *FCGR2B* et *FCGR3B* est intercalé entre *FCGR2B* et *FCGR2C* en position télomérique par rapport à *FCGR3A*. Les 2 gènes sont constitués de 5 exons, 2 pour les séquences signal (S1 et S2), 2 pour les domaines extracellulaires (EC1 et EC2) et 1 exon commun (TM/C) aux domaines transmembranaire et intracellulaire (Figure 13) (van de Winkel et Capel, 1993, Su et al., 2002).

Il existe un polymorphisme pour Fc γ RIIIA déterminé par la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 158 (158V versus 158F). Fc γ RIIIA-158V possède une affinité plus forte pour IgG1 et IgG3 comparé à l'allèle Fc γ RIIIA-158F. Trois allèles pour Fc γ RIIIB ont été décrits dans les neutrophiles. Les formes NA1, NA2 et SH ne présentent pas de modification dans l'affinité pour leur ligand, cependant NA2 présente une capacité moindre à la phagocytose (Takai, 2002).

Les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* codent respectivement pour un récepteur avec une partie intracytoplasmique d'environ 25 aa (Fc γ RIIIA) et pour un récepteur (Fc γ RIIIB) à ancrage membranaire par un domaine Glycosyl Phosphatidyl-Inositol (GPI). Les récepteurs Fc γ RIII sont des protéines de 50 à 80 kD (selon leur niveau de glycosylation).

Fc γ RIIIA est retrouvé dans les monocytes, macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules NK et certains lymphocytes T alors que Fc γ RIIIB est exprimé sélectivement dans les polynucléaires (Braakman et al., 1992 ; van de Winkel et Capel, 1993 ; Takai, 2002).

Des formes solubles des récepteurs Fc γ RIII ont été également mises en évidence. Ces récepteurs solubles résultent soit d'une libération membranaire par protéolyse (Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB), soit de la synthèse d'un isoforme particulier dépourvu de portion transmembranaire (Fc γ RIIIA). Il a été décrit que les formes solubles des Fc γ R peuvent moduler les réponses inflammatoires.

2.4. Les récepteurs Fc γ RIV

Le gène *Fcgr4* a été récemment identifié chez la souris (Nimmerjahn et al., 2005) localisé sur le chromosome 1 à proximité des gènes *Fcgr2b-Fcgr2* (Figure 14). L'équipe de Ravetch a identifié la position du gène Fc γ RIV à partir d'un certain nombre de « bacterial artificial chromosome » (BAC) couvrant le locus Fc γ RII-Fc γ RIII. Cette étude a révélé que le gène *Fcgr4* est constitué de 5 exons, 2 pour les séquences signal (S1 et S2), 2 pour les domaines extracellulaires (EC1 et EC2) et 1 exon commun (TM/C) aux domaines transmembranaire et intracellulaire. Ces caractéristiques sont conservées au niveau des gènes de la chaîne α du récepteur Fc γ RIII chez la souris ainsi que chez l'homme ce qui indique un gène ancestral commun pour Fc γ RIII et Fc γ RIV. Une étude comparative des protéines place le récepteur Fc γ RIIIA comme son équivalent chez l'homme. (Nimmerjahn et Ravetch, 2006)

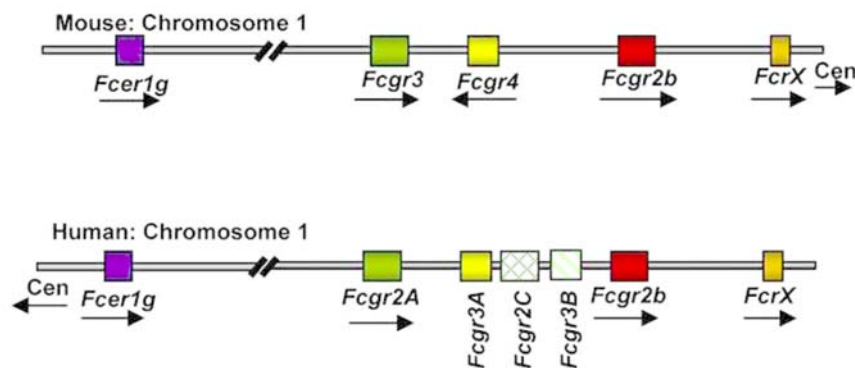


Figure 14. Localisation chromosomique et organisation génomique des gènes codant pour les Fc γ RIV. D'après Nimmerjahn et Ravetch, 2006.

Les travaux de Nimmerjahn et al ont montré que les récepteurs Fc γ RIV sont exprimés dans les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et dans les cellules dendritiques, alors qu'ils sont absents dans les mastocytes, les cellules NK et dans les cellules T et B. De plus, l'expression à la surface cellulaire est augmentée par LPS et IFN- γ et diminuée par IL 4 et TGF- β . Une différence entre Fc γ RIV chez la souris et le Fc γ RIIIA humain consiste en l'absence de Fc γ RIV dans les cellules NK. Les neutrophiles humains n'expriment pas Fc γ RIIIA mais plutôt Fc γ RIIA comme leur récepteur activateur (Nimmerjahn et al., 2005).

La diversité des récepteurs pour le fragment Fc des Immunoglobulines G, l'hétérogénéité retrouvée dans l'expression tissulaire, au niveau moléculaire et protéique, ainsi que leur modulation par les cytokines inflammatoires reflète, de cette façon, une activité fonctionnelle complexe au sein de l'immunité cellulaire.

3. Fonctions cellulaires des récepteurs Fc γ R

La spécificité fonctionnelle de chacun de ces récepteurs Fc γ R est déterminée par les caractéristiques structurales de sa partie intracellulaire. On distingue ainsi 2 grandes classes de récepteurs, les Fc γ R activateurs et le récepteur inhibiteur Fc γ RIIB (Figure 11).

Les récepteurs activateurs sont caractérisés par 2 séquences consensus YXXL/I répétées, séparées par 6 à 8 acides aminés variables (D/E-Y-X-X-L/I-X6-8-Y-X-X-L/I) qui forment le motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based. Activation Motif) (Cambier, 1995). Ce motif est responsable de la mise en jeu de voies de signalisation activatrices.

Fc γ RIIB possède une séquence consensus unique, I/V/L/S-X-Y-X-X-L/V (Muta et al., 1994), formant le motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based. Inhibition Motif) qui met en jeu des voies de signalisation inhibitrices.

La nature de la réponse cellulaire dépend donc du type de récepteur exprimé, mais également de l'isoforme et de l'existence de polymorphismes. Sa spécificité dépend également du type

cellulaire dans lequel le récepteur est exprimé, le même récepteur exprimé dans des cellules différentes pouvant induire des réponses cellulaires différentes. De plus, les récepteurs activateurs et inhibiteurs sont souvent co-exprimés par la même cellule permettant le co-engagement de 2 types de signalisations opposées. Ainsi, la réponse cellulaire dépendrait du rapport quantitatif entre ces 2 types de récepteurs.

La fonction la plus importante de récepteurs pour le fragment des IgG, les Fc γ R, est la régulation positive et négative des réponses immunes cellulaires comme la prolifération lymphocytaire B, la phagocytose par macrophages et la dégranulation de mastocytes (Figure 14A). L'engagement des récepteurs activateurs déclenche différents processus biologiques tels que la phagocytose, la cytolyse, la dégranulation et l'activation transcriptionnelle de gènes pour les cytokines, capables d'initier une cascade inflammatoire. Simultanément, dans la plupart des cas, l'engagement de l'unique récepteur inhibiteur, Fc γ RIIB, module ces réponses effectrices.

Une autre activité fonctionnelle au sein des récepteurs Fc γ est l'internalisation des complexes immuns (ICs) (Figure 15B). Les récepteurs Fc γ peuvent déclencher l'internalisation d'ICs capturés par la cellule qui mène à leur dégradation et présentation des peptides par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, MHC de classe I ou II. Les macrophages éliminent efficacement les ICs alors que les cellules dendritiques sont plus spécialisées dans la présentation antigénique.

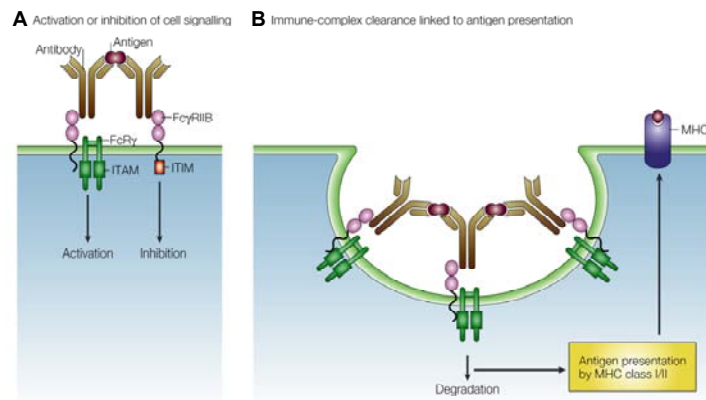


Figure 15. Les principales fonctions des récepteurs pour le fragment des IgG, les Fc γ R. (A) Régulation positive et négative des réponses immunes cellulaires. (B) Internalisation des complexes immuns (ICs). D'après Takai, 2002

3.1. Fc γ RIIB, le récepteur Fc γ R à motif ITIM

Il s'agit d'un récepteur monomérique avec une seule chaîne transmembranaire, portant à la fois le site de fixation du fragment Fc des IgG (domaine extracellulaire) et le motif ITIM de signalisation négative (domaine intracellulaire) (Figure 11).

L'identification du motif ITIM remonte à la mise en évidence d'une séquence de 13 acides aminés, nécessaire et suffisante à la régulation négative par le Fc γ RIIB de l'activation BCR dépendante des lymphocytes B (Amigorena et al., 1992). Cette séquence est caractérisée par la présence d'une tyrosine suivie par une leucine en position Y+3, définissant un motif minimum YxxL, réminiscence du motif ITAM. La caractéristique fonctionnelle de ce motif est qu'il peut inhiber les voies de signalisation activatrices de n'importe quel récepteur à motif ITAM, tel que le BCR, la chaîne ζ du TCR, le Fc γ RI et les récepteurs FcR activateurs (Daeron et al., 1995).

Ces données ont permis de définir la superfamille des récepteurs inhibiteurs qui regroupe les récepteurs caractérisés par la présence d'un motif ITIM et des fonctions régulatrices négatives de l'activation cellulaire (Ravetch et Lanier, 2000). Les premiers à avoir été identifiés sont les « Killer cells Ig like receptor » (KIR ou CD158) sur les cellules NK. Par la suite, 2 autres groupes exprimés par les cellules NK et les lymphocytes T ont été identifiés : Ly49 et CD94/NKG2 (Ravetch and Lanier, 2000). Le lymphocyte B exprime également d'autres récepteurs inhibiteurs avec un motif ITIM souvent constitutivement phosphorylé : les récepteurs CD22, CD5, CD72, CD66a, ILT, PIR-B, PD-1, et LAIR-1 (pour revue Ravetch et Lanier, 2000 ; Nitschke et Tsubata, 2004).

3.1.1. Fc γ RIIB comme régulateur de l'activation cellulaire B

Durant les étapes précoces du développement lymphocytaire B (Partie I, paragraphe 1) dans la moelle osseuse, les « central checkpoints » comme le « receptor editing » (Figure 2), l'anergie et la délétion cellulaire assurent l'élimination des cellules ayant un BCR auto réactif. Cependant, un certain nombre de cellule B auto réactives peuvent échapper à ces points de contrôles vers la périphérie, s'ajoutant au pool des cellules auto réactives générées par mutations somatiques.

Ainsi les « peripheral checkpoints » au niveau du centre germinatif dans les organes lymphoïdes secondaires comme les délétions et l'anergie assurent aussi le maintien d'équilibre immunitaire.

Malgré ces contrôles intenses pour maintenir la tolérance immunitaire, ce processus est incomplet. Il a été montré que les cellules B auto réactives peuvent être générées « de novo » lors de la réaction du centre germinatif (Ray et al., 1996). De plus, très récemment les travaux de Fukuyama et al ont démontré l'implication de $Fc\gamma RIIB$ dans le contrôle de la tolérance. Dans un modèle de souris transgénique le « knockout » du gène *fcgr2b* a provoqué l'expansion des plasmocytes sécrétant des anticorps IgG auto réactifs avec le développement d'une maladie « lupus-like » sévère. Par conséquent, l'existence des points de contrôles supplémentaires sont très importants pour prévenir l'accumulation de ces cellules auto réactives. Ainsi, l'équipe de Ravetch suggère le rôle du récepteur $Fc\gamma RIIB$ comme un « distal checkpoint » dans le maintien de la tolérance immunitaire. $Fc\gamma RIIB$ représenterait un point de contrôle tardif dans le contrôle de l'expansion des cellules auto réactives et de leur différenciation en plasmocytes (Figure 16).

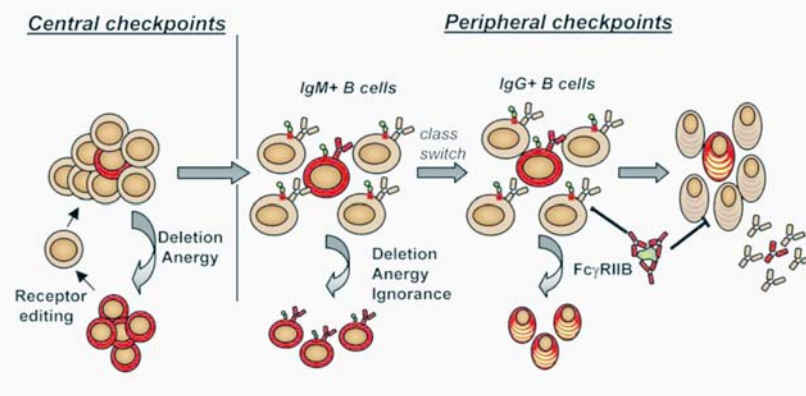


Figure 16. Points de contrôle des cellules B autoréactives durant le développement. D'après Nimmerjahn et Ravetch, 2006.

En effet, Fc γ RIIB peut réguler l'activation de la cellule B de deux façons distinctes : le co-engagement de Fc γ RIIB avec le récepteur pour l'antigène des lymphocytes B (BCR), entraîne une cascade de signalisation négative responsable du blocage des voies activatrices BCR dépendantes. Les conséquences pour le lymphocyte B sont un blocage de l'influx calcique, un arrêt de la prolifération s'accompagnant dans certaines conditions d'une mort cellulaire par apoptose (Ravetch et Lanier, 2000). Parallèlement, il a été montré que le recrutement de récepteurs Fc γ RIIB seuls (à l'aide d'anticorps anti-Fc γ RII), entraîne la mort cellulaire dans des lymphocytes B murins (Ono et al., 1997 ; Pearse et al., 1999 ; Tzeng et al., 2005). Ainsi, ces réponses négatives participent au contrôle de la réponse immune et de l'élimination des clones B auto-réactifs.

Fc γ RIIB et BCR (ITIM-dépendante)

Le modèle le plus largement décrit est celui de la co-ligation de Fc γ RIIB et du BCR par l'intermédiaire du fragment Fc d'une Ig anti chaîne μ . Le BCR est un complexe membranaire composé d'une immunoglobuline de surface (capable de fixer l'antigène) associée de façon non covalente à 2 hétérodimères Ig α et Ig β . Les domaines cytoplasmiques des Ig α et β portent un motif ITAM initiateur des voies de signalisation activatrices.

L'interaction du BCR avec un antigène induit son agrégation et ensuite la phosphorylation des tyrosines du motif ITAM par les kinases de la famille Src (Lyn, Blk, Fyn et de façon moins importante Lck et Fgr) et des familles Syk et Tec (Btk). Ces tyrosines kinases vont permettre le recrutement et l'activation de la PLC γ , permettant l'augmentation du calcium intracellulaire. La phosphorylation du corécepteur CD19 amplifie le signal par le recrutement de la PI3K et par conséquent, la synthèse de PIP3 permettant l'activation de protéines à domaines PH telles que la Btk et l'Akt. La voie ras et en aval, les MAP Kinases (ERK, p38) sont activées suite à la formation d'un complexe sos-grb2, permettant l'induction de la prolifération de lymphocytes B au repos via le BCR (Figure 17) (Gauld et al., 2002). L'activation cellulaire B demande, ainsi une réponse bioénergétique importante pour l'expression de gènes et la synthèse « de novo » des protéines cellulaires (Buttgereit et al., 2000 ; Fox et al., 2005).

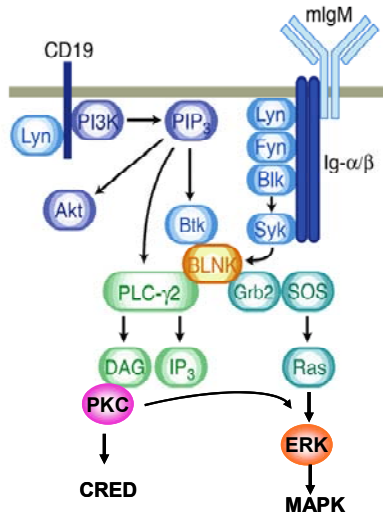


Figure 17. Voies de signalisation BCR-dépendantes. La figure représente un exemple des différentes voies de signalisation mises en jeu par le recrutement du BCR par un antigène. D'après Gauld, 2002

Le co-engagement des 2 récepteurs induit une cascade de signalisation négative, dont le point de départ est la phosphorylation du motif ITIM, entraînant le blocage des signaux d'activation BCR dépendant, par le recrutement de phosphatases (Figure 18) (Ravetch et Bolland, 2001).

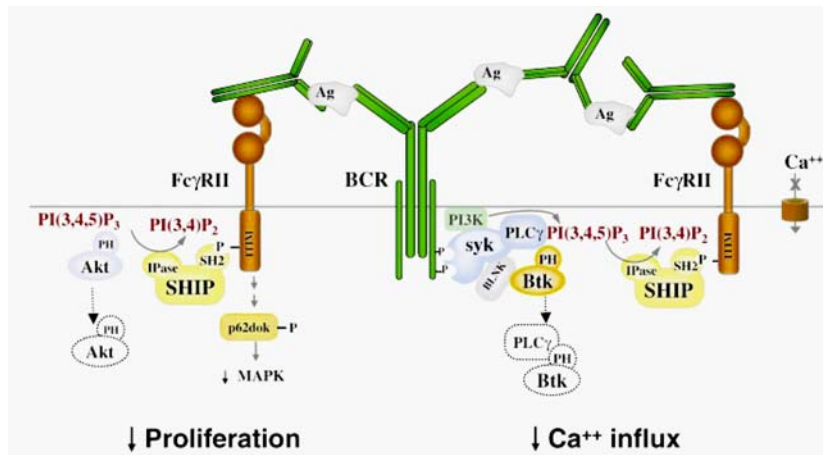


Figure 18. Voies de signalisation négative activées par la co-ligation du BCR et de Fc γ RIIB. L'activation cellulaire (prolifération, influx de calcium) est inhibée par le recrutement de SHIP sur le motif ITIM phosphorylé. Les cibles potentiellement régulées par SHIP sont en pointillé. D'après Ravetch et Bolland, 2001.

Cette signalisation négative empêche l'entrée en phase G1 des cellules lymphocytaires B. (Phillips et al., 1988; Phillips and Parker, 1984). Cette régulation semble être liée au degré de maturation des lymphocytes B. Ainsi, dans des lignées pré-B, la co-ligand du pré-BCR et de Fc γ RIIB délivre un signal de survie (Kato et al., 2002). De plus, il a été montré qu'un anticorps anti Fc γ R pouvait entraîner une augmentation significative de la croissance et de la différenciation de précurseurs B et T (de Andres et al., 1998) (Sandor et al., 1994). Récemment, Doughty et al., ont mis en évidence pour la première fois l'implication de Fc γ RIIB dans le métabolisme énergétique. L'utilisation du glucose nécessaire pour l'activation B est inhibée lors du co-engagement du BCR avec Fc γ RIIB (Doughty et al., 2006).

Fc γ RIIb1 peut également réguler de façon négative la présentation BCR dépendante de l'antigène. En condition de co-ligand avec le BCR, il agit comme un inhibiteur dominant empêchant l'endocytose de l'antigène via le BCR (Minskoff et al., 1998). Par contre, l'isoforme Fc γ RIIb2, différente de Fc γ RIIb1 dû à l'absence de la séquence de 19aa supplémentaire retrouvé sur Fc γ RIIb1, a la capacité d'endocyter l'antigène sous forme d'immuns complexes permettant sa présentation aux lymphocytes T CD4+, en association avec les molécules de CMH de classe II (Amigorena et al., 1998).

a) Mécanismes moléculaires de l'inhibition de la signalisation du BCR

i) Phosphorylation de Fc γ RIIB

La co-agrégation de Fc γ RIIB murin et du BCR entraîne la phosphorylation du motif ITIM par des tyrosine-kinases de la famille des Src kinases. La tyrosine kinase Lyn joue un rôle particulier dans la signalisation négative induite par Fc γ RIIB. Dans des souris Lyn $-/-$, la phosphorylation de Fc γ RIIB est diminuée et on observe une augmentation de l'activation lymphocytaire B, associée à la production d'auto-anticorps (Chan et al., 1998).

ii) Recrutement de SHIP

Cette phosphorylation confère au motif ITIM la capacité de recruter (par leurs domaines SH2) les tyrosines phosphatases SHP1 et 2 et les inositol 5' phosphatases SHIP1 et 2. SHP1 et 2

possèdent 2 domaines SH2 et ont pour substrats des protéines phosphorylées sur leurs résidus tyrosines. SHIP1 et 2 sont caractérisées par un domaine SH2, un domaine riche en proline et un site catalytique capable d'hydrolyser les phosphates en 5' des inositol 4,5 et 3,4,5 phosphates (IP2/IP3) et des phosphatidyl-inositol 4,5 et 3,4,5 phosphates (PIP2/PIP3) (Ono et al., 1996)

SHIP1 est nécessaire et suffisante pour les fonctions régulatrices négatives de Fc γ RIIB. L'analyse par co-précipitation des phosphatases recrutées par Fc γ RIIB, montre son association préférentielle avec SHIP1. De plus, les mutations/délétions et l'utilisation de dominants négatifs de SHIP ont démontré le rôle clef de cette phosphatase dans la signalisation inhibitrice Fc γ RIIB dépendante (Coggeshall, 1998 ; Ono et al., 1996). Le rôle majeur de SHIP1 est également démontré dans des souris SHIP1 *-/-* qui présentent une augmentation anormale des lymphocytes B, associée à une production d'anticorps dérégulée et à de nombreuses anomalies des organes lymphoïdes (Liu et al., 1999). Une étude récente a démontré la possibilité d'une régulation négative induite par SHIP2, en l'absence de SHIP1, dans des lymphocytes B murins stimulés par le LPS (Brauweiler et al., 2001).

iii) Voie des inositols phosphates

Régulation négative du flux calcique

Le substrat majeur de SHIP est PIP3, un produit de la phosphorylation de PIP2 par la PI3K. PIP3 joue un rôle important dans l'activation de protéines à domaine PH (Plekstrin Homology domain), telles que la phospholipase γ C (PL γ C) et Btk, en permettant leur localisation membranaire. En l'absence de PIP3, ces protéines sont inactivées, entraînant en particulier un blocage des modifications du calcium intracellulaire (Bolland et al., 1998; Scharenberg et al., 1998) (Figure 19A). Le niveau de PIP3 peut être, d'autre part, modulé par l'inactivation de la PI3k dû à la déphosphorylation du CD19 (Fong, et al., 2000). Akt, qui est une sérine-thréonine kinase impliquée dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire, peut être inactivée par le même mécanisme d'interférence par rapport à sa localisation membranaire (Carver et al., 2000). (Figure 19B)

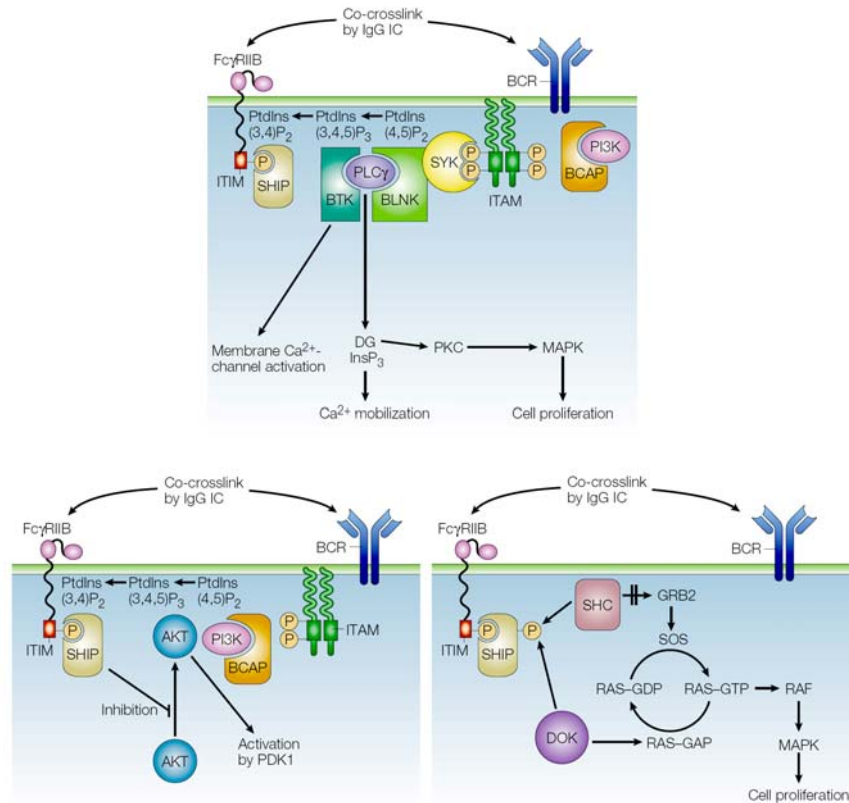


Figure 19. Mécanismes moléculaires de la régulation négative du récepteur pour l'antigène des Lymphocytes B (BCR) par Fc γ RIIB. (A) La voie des inositols phosphates. Régulation négative du flux calcique. (B) La voie AKT. (C) La voie ras - p62dok. Régulation négative de la prolifération. D'après Takai, 2002.

iv) Voie ras - p62dok

Régulation négative de la prolifération

Fc γ RIIB peut inhiber l'activation de la voie ras (Figure 19C). SHIP phosphorylée peut s'associer avec la protéine adaptatrice shc, en compétition avec le complexe sos-grb2, entraînant un blocage de l'activation de p21ras (Tridandapani et al., 1997). D'autre part, Fc γ RIIB peut réguler la voie ras via la phosphorylation de p62^{dok}. p62^{dok} phosphorylée inactive la voie ras (par hydrolyse de rasGTP en rasGDP) grâce à son interaction avec le domaine SH2 de la RasGAP (ras activating protein). L'équipe de Cambier a montré que la phosphorylation de p62^{dok} était fortement augmentée par la co-agrégation du BCR et de Fc γ RIIB. Cette réponse est corrélée

avec la phosphorylation de SHIP et la formation d'un complexe p62^{dok}-SHIP, entre les résidus phosphorylés de SHIP et les domaines PTB (Phosphotyrosine-Binding domain) de la p62^{dok} (Tamir et al., 2000). Cette phosphorylation de p62^{dok} entraîne le blocage de l'activation d'Erk.

Le blocage en G1-S résulterait de l'inhibition de la phosphorylation de Rb, de l'inhibition de l'activation des cyclines dépendante-kinases CDK4/6 et CDK2 et d'une diminution de p27^{KIP1}. L'inactivation des CDK4/6 est secondaire à un défaut de leur assemblage avec les cyclines D, alors que l'inhibition de CDK2 résulterait d'une diminution de son expression (Tanguay et al., 1999). De façon intéressante, la régulation du cycle cellulaire par Fc γ RIIB a été également démontrée dans un modèle non lymphocytaire (Malbec et al., 1999). La co-ligand de Fc γ RIIB et du récepteur pour le SCF (C-Kit) dans des cellules mastocytaires bloque la prolifération cellulaire (blocage de la transition G1-S). Ce blocage nécessite la phosphorylation de SHIP et s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation de Erk, de Akt, de JNK ainsi qu'une diminution des cyclines D2/D3 et A (Malbec et al., 2001).

De la même manière, le récepteur Fc γ RIIB humain est capable d'inhiber la mobilisation du calcium et la voie ras lorsqu'il est recruté avec le BCR dans les lymphocytes B humains. Dans un modèle de souris le récepteur Fc γ RIIB humain est capable de réguler négativement la mobilisation calcique induite par le BCR (Van Den Herik-Oudjijk et al., 1994 ; Koncz et al., 1999). La diminution de l'activité de la voie ras, par l'inactivation partielle de p21ras, suite au recrutement de Fc γ RIIB1 avec le BCR, a été démontrée dans une lignée lymphocytaire B humaine (Sarmay et al., 1996). Le récepteur Fc γ RIIB humain possède le même motif ITIM que celui décrit chez la souris ; lorsqu'il est phosphorylé, il recrute aussi les phosphatases à domaines SH2. Koncz et al ont montré pour la première fois, que Fc γ RIIB humain est associé avec SHP-2 après son engagement avec le BCR (Koncz et al., 1999).

L'ensemble de ces travaux montre que indépendamment de l'espèce, la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB observée dans un lymphocyte B mature est dépendante du motif ITIM et du recrutement de la phosphatase SHIP. Néanmoins, il existe d'autres résidus de tyrosines passibles de subir des phosphorylations.

b) Rôle des phosphorylations de Fc γ RIIB en dehors du motif ITIM

L'analyse par mutation de la partie intracellulaire du Fc γ RIIB murin suggère que d'autres régions que le motif ITIM participent à la régulation négative. La délétion de l'extrémité C-terminale (16 derniers résidus) de la partie intracellulaire du récepteur empêche la fixation stable de SHIP, dont dépend l'hydrolyse de PIP3 et l'inhibition du flux calcique. Par contre, cette région ne régule pas l'activation des kinases ERK1/2. Cette extrémité contient une tyrosine Y326 qui est phosphorylée après co-ligation et qui pourrait participer à l'ancrage stable de SHIP, par l'intermédiaire de grb2. D'autres tyrosines de la partie intra-cytoplasmique du récepteur peuvent être phosphorylées, en particulier les tyrosines intra-cytoplasmiques Y290, 309 et 326 et les tyrosines Y325 et 264 qui le sont à un niveau moindre. La phosphorylation de tyrosine 325 serait associée à la déphosphorylation du corécepteur CD19 (Figure 20). Ces données suggèrent la possibilité de l'activation de voies de signalisation négative, indépendamment de la phosphorylation du motif ITIM (Fong et al., 2000). Plus récemment, Isnardi et al ont montré que le recrutement de SHIP1 est nécessaire à la signalisation négative de Fc γ RIIb1 humain. Ce recrutement aurait lieu au niveau de l'extrémité C-terminale sans recrutement de grb2. Contrairement au Fc γ RIIB murin, l'extrémité C-terminale du récepteur humain ne possède pas de résidu tyrosine, bien qu'elle exécute la même fonction (Isnardi et al., 2006). Indépendamment du site de phosphorylation du motif ITIM, la protéine phosphatase SHIP semble être un élément clé de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB.

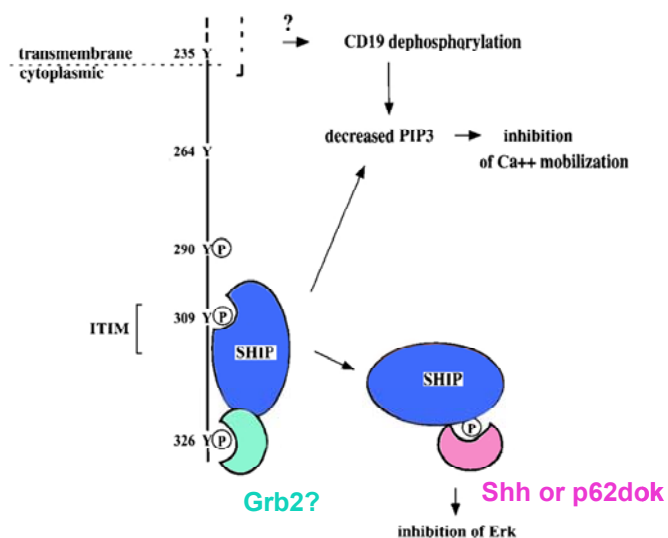


Figure 20. Sites potentiels de phosphorylation de la partie intra-cytoplasmique du Fc γ RIIB murin. Sont représentés, les sites de liaison de SHIP sur et en dehors du motif ITIM. D'après Fong et al., 2000.

Fc γ RIIB et Apoptose (ITIM-indépendante)

Le recrutement de récepteurs Fc γ RIIB seuls (par pontage d'un anticorps anti Fc γ RII) peut entraîner la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes B murins. La seule dimérisation du récepteur n'entraîne pas de réponse apoptotique. Dans ces conditions expérimentales, il n'y a pas de phosphorylation du récepteur (donc pas de recrutement de SHIP) ni d'inhibition du flux calcique. La délétion complète de la partie intra-cytoplasmique de Fc γ RIIB ne supprime pas cette mort cellulaire, démontrant l'implication de voies de signalisation différentes de celles activées par la co-ligation de Fc γ RIIB et du BCR. Par contre, l'insertion du domaine transmembranaire de Fc γ RIIB permet de transférer à un autre récepteur (CD8) cette fonction. Le rôle spécifique de ce domaine est également démontré par l'absence d'effet apoptotique des récepteurs Fc γ RIIB (caractérisé par un domaine GPI) ou de Fc γ RIIA qui possède le domaine transmembranaire de la chaîne ζ du TCR.

L'invalidation de SHIP ou la mutation de la tyrosine du motif ITIM (empêchant le recrutement de SHIP) permet de déclencher cette réponse apoptotique lorsque Fc γ RIIB est co-engagé avec le BCR. Ces données suggèrent que l'apoptose Fc γ RIIB dépendante, à l'inverse de la signalisation négative par interaction avec un récepteur à motif ITAM, est masquée par SHIP. Dans le même modèle expérimental, la délétion du récepteur inhibiteur KIR diminue cette réponse apoptotique via le recrutement de SHP1 (Ono et al., 1997). L'effet protecteur de SHIP est dépendant de son activité phosphatase. La délétion du domaine à activité phosphatase lève cet effet protecteur (Pearse et al., 1999).

La mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la Jun N-terminal Kinase (JNK). De plus, dans des lignées Btk $-/-$, on observe une diminution de 50% de la réaction apoptotique, suggérant que l'apoptose Fc γ RIIB serait dépendante de l'expression de la protéine Btk. L'équipe de Smith a montré que l'activation de Btk (secondaire à son interaction avec PIP3) entraînait sa localisation membranaire suivie d'un transfert dans le noyau,

suggérant des fonctions nucléaires pour Btk (Mohamed et al., 2000). SHIP, en diminuant le taux intracellulaire de PIP3, pourrait réguler l'apoptose Fc γ RIIB dépendante en bloquant le mécanisme d'activation par translocation membranaire de Btk (Figure 21).

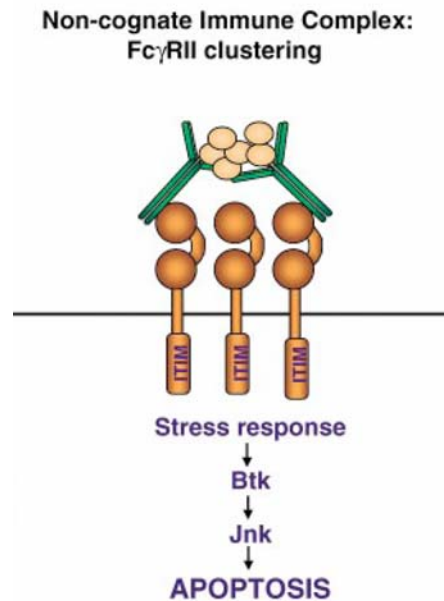


Figure 21. Modèle de l'apoptose Fc γ RIIB dépendante. Le recrutement de récepteurs Fc γ RIIB par des complexes immuns non spécifiques (pas d'interaction avec le BCR) entraîne l'apoptose des lymphocytes B, par une voie de signalisation nécessitant l'expression de la Btk et activant la JNK. D'après Ravetch et Bolland, 2001.

Très récemment, l'équipe de Pierce a montré dans un modèle expérimental, que le processus apoptotique déclenché par Fc γ RIIB dans les lymphocytes B murins est indépendant de la phosphorylation du motif ITIM et du recrutement de SHIP. Ils ont caractérisé, pour la première fois chez la souris que cette voie apoptotique est dépendante de caspases et de la dépoliarisation de la membrane mitochondriale avec libération du cytochrome c. De plus, ce travail a montré le rôle de la famille de kinases Abl au cours de cette signalisation. L'activité kinase de la protéine c-Abl est dérégulée dans différents types d'hémopathies malignes, notamment dans la Leucémie Myéloïde Chronique (CML), toutefois son rôle dans la signalisation lymphoïde normale nécessite plus de travaux (Tzeng et al., 2005).

La mort cellulaire des cellules B murines spléniques induite par Fc γ RIIB a été décrite aussi par Carter et Harnett dans une condition de co-recrutement avec le BCR. L'étude a montré que la prolifération des cellules B est inhibée suite à la co-ligation des récepteurs. En plus de cette inhibition, les cellules B suivent une voie apoptotique indépendante de caspases (Carter et Harnett, 2004). A l'heure actuelle, cette fonction pro-apoptotique du récepteur Fc γ RIIB, dans les cellules B humaines n'est pas étudiée.

Fc γ RIIB et auto-immunité

Le développement de maladies auto-immunes est complexe et dépendant de la susceptibilité de certains gènes ainsi que des facteurs de l'environnement. Par conséquent, les modèles animaux sont très utiles pour élucider le contrôle génétique des différentes voies empruntées qui mène à ce type de maladie. Les récepteurs Fc γ RIIB sont maintenant considérés comme importants régulateurs liés à l'auto-immunité.

En effet, les souris déficientes en Fc γ RIIB présentent une dérégulation des différentes réponses, telles qu'une élévation du niveau d'immunoglobulines, une augmentation de la réponse anaphylactique cutanée et systémique, ainsi qu'une réponse inflammatoire excessive induite par les ICs.

Les différents modèles animaux ont permis de mettre en évidence l'implication du récepteur Fc γ RIIB dans l'auto-immunité (Figure 22). Par exemple, l'inactivation sélective de Fc γ RIIB permet l'émergence de clones B auto-réactifs et la production d'auto-anticorps, pouvant entraîner le développement spontané d'une maladie lupique (avec anticorps anti ADN et chromatine) (Bolland et al., 2002 ; Fukuyama et al., 2005) ou de syndromes inflammatoires articulaires et rénaux (Yuasa et al., 1999, Nakamura et al., 2000).

Les polymorphismes de récepteurs Fc γ RIIB, décrit ci-dessus (chapitre II, paragraphe 2.2.), sont également associés aux syndromes auto-immuns, puisque dans la plupart de situations ces mutations génèrent la diminution de l'activité fonctionnelle du récepteur.

Fc γ RIIb	Attenuated effect of IVIG treatment; enhanced CIA after immunization with C-II; enhanced development of Goodpasture's syndrome after C-IV immunization; spontaneous development of glomerulonephritis on C57BL/6 background; enhanced Arthus reaction; enhanced IC-induced alveolitis; enhanced IgG- and IgE-induced systemic anaphylaxis; enhanced anti-GBM antibody-induced glomerulonephritis; enhanced IgG1-induced local anaphylaxis
------------------	---

Figure 22. Phénotype de souris déficient en Fc γ RIIB. D'après Takai, 2002

3.1.2. Fc γ RIIB et autres effecteurs du système immune

Fc γ RIIB et les cellules dendritiques

L'expression du récepteur Fc γ RIIB est également retrouvée dans les cellules dendritiques (DC). Les DCs constituent une famille hétérogène des cellules impliquées dans le contrôle de la réponse immune et dans l'immunité innée au adaptative. Les DCs présentent un rôle particulier dans l'initiation des réponses immunes à travers leur capacité d'induction des lymphocytes T naïfs en lymphocytes effecteurs en fonction de leur stade de maturation (Gabert, 2005). Les ICs peuvent induire la maturation de DC et augmenter l'efficacité de la présentation antigénique. Le récepteur Fc γ RIIB est capable de contrôler leur maturation. En effet, les DCs déficientes en Fc γ RIIB présentent une capacité de générer des réponses lymphocytaires T dépendantes d'antigène plus prononcées (Kalergis et Ravetch, 2002). De plus, l'internalisation d'IC par les DC est réalisée par Fc γ RIIb2. Il a été montré que la délétion de Fc γ RIIB dans les DC induit une réduction de la capacité d'internalisation des ICs (Yada et al., 2003). Récemment, il a été montré que les DC sont capable de présenter l'antigène, après son internalisation, également aux cellules B permettant l'engagement du BCR (Bergtold et al., 2006).

Fc γ RIIB et cellules inflammatoires

Outre les fonctions régulatrices au niveau des réponses afférentes, Fc γ RIIB est un important modulateur dans les cellules inflammatoires comme les cellules mastocytaires, les neutrophiles et les macrophages durant les phases efférentes de la réponse immune. Dans ces types cellulaires Fc γ RIIB est co-exprimé avec les récepteurs Fc activateurs et est capable de réguler les signaux activateurs contrôlant l'induction de réactions inflammatoires. En effet, dans différents modèles animaux d'inflammation, la déficience de Fc γ RIIB conduit à une augmentation de la réponse inflammatoire induite par les ICs ainsi que la phagocytose (Nimmerjahn et Ravetch 2006)

3.1.3. Fc γ RIIB et oncogenèse

Les anomalies 1q sont particulièrement fréquentes dans les LMNH. L'équipe de Whang-Pheng a été la première à avoir souligné leur fréquence dans les LMNH et à définir 2 zones critiques de duplication allant de 1q12 à 1q31 ou de 1q21 à 1q31 (Douglass et al., 1980). Les analyses cytogénétiques dans différents entités de LMNH et de Leucémies Lymphoblastiques Aiguës ont révélé la bande 1q21-23 comme étant un « hotspot » pour les translocations chromosomiques impliquant le gène *FCGR2B*.

En effet, notre équipe a cloné à partir d'une lignée cellulaire (B593) dérivée d'un lymphome folliculaire, le point de cassure d'une translocation équilibrée t(1;22)(q22;q11) (Callanan et al., 2000). Le point de cassure est situé juste en amont du gène *FCGR3B*, à 20 kb de *FCGR2B* (en position télomérique). Cette translocation entraîne la dérégulation du gène *FCGR2B* par juxtaposition à l'enhancer Ig λ 3' avec une hyper-expression de plus de 30 fois, de 2 transcrits majoritaires de 1.5 et 2.4 kb. De manière intéressante, le gène *FCGR2B* n'est pas interrompu par ces translocations. La conséquence principale en est ainsi la surexpression d'un récepteur Fc γ RIIB normal. L'isoforme Fc γ RIIb2 est particulièrement surexprimé dans la lignée B593 et chez 2 patients présentant la même translocation, démontrant le caractère récurrent de cette anomalie.

Une dérégulation de *FCGR2B* a été retrouvée dans une lignée de lymphome folliculaire avec t(1;14)(q21;q32) (Chen et al., 2001). Le point de cassure est situé environ 20 kb en aval de *FCGR2B* et à 5 kb en amont de *FCGR3B*. La translocation juxtapose la région 5' du gène *IGH* avec *FCGR2B* sur le der(1). Comme décrit par Callanan et al, cette translocation entraîne une hyper-expression de l'isoforme Fc γ RIIb2. Une étude de 76 lymphomes folliculaires présentant une anomalie 1q21 a retrouvé 1 cas supplémentaire de lymphome folliculaire présentant une dup(1)(1q21-25) associée à une t(14;18), sans que l'expression de *FCGR2B* n'aie pu être étudiée.

Plus récemment une autre dérégulation du gène *FCGR2B* dans un cas atypique de Leucémie Lymphoblastique Aiguë à été démontrée. Contrairement à l'implication classique des gènes *IG* dans les translocations, l'analyse par southern blot de la translocation t(1,2)(q22-23;p13) décrite par Greer et al n'a pas mis en évidence l'implication du gène *IGH κ* sur le chromosome 2p12 (Greer et al., 2003).

A partir d'une étude sur tissu lymphoïde réactionnel et d'une centaine de lymphomes B, l'équipe de Sautès-Fridman suggère que l'expression élevée du récepteur Fc γ RIIB dans les lymphomes B semble être un facteur de mauvais pronostic (Camilleri-Broët et al., 2004b). L'expression du récepteur Fc γ RIIB a été identifiée dans 52% de lymphomes folliculaire et dans 20% de lymphome diffus à grande cellules (DLBCL). De plus, une surexpression des récepteurs Fc γ RIIB, identifiée dans le sous groupe cellules B-activées de DLBCL, est associée avec un pronostic péjoratif.

Enfin, l'étude de coopération oncogénique dans la leucémogénèse myéloïde à révélé que *Fcgr2b* est capable d'accélérer le caractère malin induit par le gène de fusion leucémique, NUP98-HOXA9. Dans un modèle de souris transgénique exprimant le gène de fusion NUP98-HOXA9 ainsi que dans la lignée NIH 3T3 le gène *fcgr2b* coopère avec NUP98-HOXA9 dans la oncogénèse (Iwasaki et al., 2005).

Ces données sont à faveur d'un possible rôle du gène *FCGR2B* dans la progression tumorale. La surexpression constitutive de Fc γ RIIB pourrait contribuer à la tumorigénèse de cellules lymphoïdes en inhibant l'action des anticorps anti tumoraux et ainsi échapper à l'immunité anti tumorale. (Stefanescu et al., 2004). A l'heure actuelle les mécanismes oncogéniques liés à la dérégulation de Fc γ RIIB dans les lymphomes ne sont pas connus.

3.2. Les récepteurs Fc γ R à motif ITAM

Cette famille caractérisée par la présence du motif ITAM regroupe les récepteurs de haute affinité Fc γ RI (CD64) et les récepteurs de faible affinité Fc γ RII A/C (CD32) et Fc γ RIIIA (CD16).

Fc γ RII (A et C) sont des récepteurs monomériques dans lesquels le motif de transduction du signal et le domaine de liaison du ligand sont directement portés par la chaîne α (Daeron, 1997; Ravetch and Bolland, 2001). Les récepteurs Fc γ RIIIA et Fc γ RI sont des complexes oligomériques composés d'une chaîne α de liaison du ligand et d'une chaîne γ et/ou ζ responsable de la transduction du signal via le motif ITAM. La chaîne γ est nécessaire à l'expression membranaire de Fc γ RIIIA et à la haute affinité des Fc γ RIA. Les chaînes γ et ζ forment des homo-dimères $\gamma\gamma$ ou $\zeta\zeta$ qui s'associent avec la chaîne α par l'intermédiaire de leur domaine transmembranaire. Elles peuvent également former des hétéro-dimères $\zeta\gamma$ dans les cellules NK (Fc γ RIIIA). Le récepteur Fc γ RIIIB se caractérise par un ancrage membranaire par un domaine GPI et par l'absence de motif de signalisation intracellulaire.

3.2.1. Fonctions cellulaires: Modèle du récepteur Fc γ RIIIA

Fc γ RIIIA est exprimé à la surface de la plupart des effecteurs de la réponse immune, monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules NK, cellules mastocytaires et polynucléaires neutrophiles. Les fonctions cellulaires induites par ces récepteurs sont très nombreuses et participent en particulier, à l'élimination de cellules anormales par cytotoxicité et/ou par phagocytose ainsi qu'à la présentation antigénique.

Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante (ADCC)

La cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante permet l'élimination, non restreinte par les molécules de CMH, de particules ou de cellules opsonisées par des IgG. Les cellules NK et les macrophages sont les effecteurs cellulaires principaux de cette cytotoxicité via le Fc γ RIIIA. Cette fonction est dépendante de l'expression de la chaîne γ , porteuse du motif ITAM (Takai et al., 1994).

Cette effet cytotoxique est observé lors de l'utilisation de l'anticorps humanisé anti-CD20 (Rituximab®) sur des cellules de lymphomes malins. L'effet anti-tumoral pourrait mettre en jeu ces mécanismes d'ADCC. (voir ci-dessous dans ce chapitre, paragraphe 4).

Le polymorphisme du Fc γ RIIIA est également susceptible de modifier l'efficacité thérapeutique in vivo de cet anticorps. La réponse clinique et moléculaire de patients atteints de lymphomes folliculaires traités par Rituximab® seul, est significativement différente (à 2 et 12 mois) entre les patients 158V homozygotes et les patients porteurs d'un ou deux allèles 158F. Ces résultats montrent l'intérêt d'une approche « pharmacogénétique » dans l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux (Cartron et al., 2002).

Phagocytose Fc γ R dépendante

Une des fonctions les plus importantes des monocytes et des macrophages est la phagocytose de particules ou de cellules opsonisées par des IgG, permettant l'élimination de micro-organismes et/ou de cellules anormales. Les études de transfections dans des cellules n'exprimant pas de récepteur endogène, ont permis de mettre en évidence le rôle de Fc γ RIIIA dans la phagocytose de particules opsonisées. Les expériences de délétions/mutations du motif ITAM ont démontré l'importance de l'intégrité du motif activateur (Indik et al., 1995).

La capacité d'endocytose du récepteur permet la présentation de l'antigène restreinte par les molécules de CMH de Classe I et II dans les macrophages (Amigorena and Bonnerot, 1999; Amigorena et al., 1992) et dans les cellules dendritiques (Regnault et al., 1999).

3.2.2. Signalisation ITAM dépendante des récepteurs Fc γ R activateurs

L'interaction avec le fragment Fc des IgG entraîne l'agrégation des Fc γ R à la surface de la cellule. Ce recrutement va entraîner une cascade de signalisation, dont le point de départ est la phosphorylation du récepteur (Daëron et Lesourne, 2006) (Figure 23).

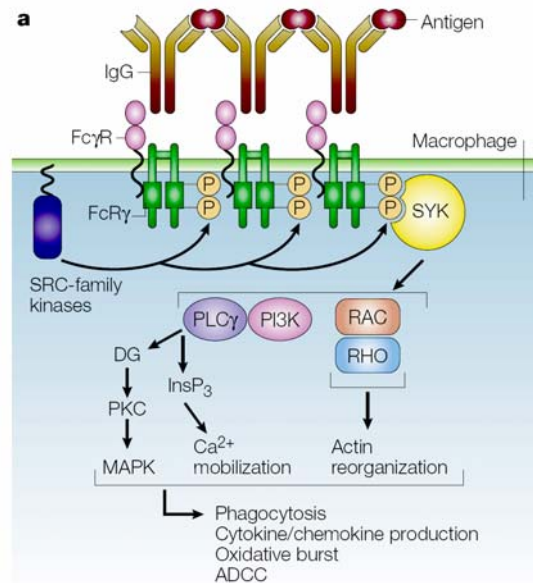


Figure 23. Mécanismes moléculaires de la signalisation par les récepteurs Fc γ activateurs. D'après Takai, 2002.

Phosphorylation du récepteur

Le récepteur est phosphorylé sur les résidus tyrosine du motif ITAM, par des tyrosine-kinases de la famille Src (lyn, lck, hck). La phosphorylation des 2 résidus tyrosine est nécessaire pour l'activation des fonctions ITAM dépendantes (Mitchell et al., 1994). Selon le type cellulaire, différentes kinases sont impliquées. Dans les cellules monocytaires, les récepteurs Fc γ R111A et 112A activent lck et hck. La protéine ZAP70 est également activée dans les cellules NK via Fc γ R111A (Cone et al., 1993). Cette phosphorylation permet l'ancrage et l'activation des kinases de la famille Syk par l'intermédiaire de leur domaine SH2 (Indik et al., 1995).

Le rôle majeur des kinases des familles Src et Syk est démontré par les études de délétions et de transfections. Des macrophages issus de souris Syk *-/-* ne peuvent pas internaliser des globules rouges opsonisés par des IgG, ni induire l'activation d'effecteurs de la signalisation (Crowley et al., 1997). De même, l'inhibition de Syk par des anti-sens bloque la phagocytose (Matsuda et al., 1996). La délétion combinée des 3 Src kinases s'accompagne d'une réduction nette mais non totale de la phagocytose, associée à une diminution du recrutement de Syk (Fitzer-Attas et al., 2000). L'absence d'inhibition totale du processus de phagocytose suggère cependant, que d'autres tyrosine-kinases puissent participer à l'initiation des voies ITAM dépendantes dans les macrophages.

Voie des inositols phosphates

Ces 2 familles de kinases vont phosphoryler des protéines telles que la PI3 Kinase (PI3K) ou la phospholipase γ C, qui participent aux voies de signalisation en aval de la phosphorylation du récepteur (Falasca et al., 1998). La PI3K peut être co-précipitée avec Syk, suggérant que les 2 protéines sont associées *in vivo* (Ninomiya et al., 1994). La PI3K va augmenter la production de PIP3 permettant l'activation de protéines à domaines PH, telles que Btk et PL γ C, qui vont induire une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire par libération et ouverture des canaux calciques (Pan et Pei, 2003).

Voie ras/contrôle de la prolifération

La voie ras peut être activée par la phosphorylation des protéines shc et grb2 permettant la formation d'un complexe grb2-sos qui va activer la protéine p21ras. Le recrutement et l'activation des MAPkinases JNK et p38 par les GTPases de la famille Rho, Rac et cdc42, ont été également décrits dans des cellules Cos transfectées avec Fc γ RIIA (Caron et Hall, 1998). Dans le noyau, ces dernières vont recruter des facteurs de transcription et conduire à l'expression de gènes cibles participant à la prolifération et à la survie cellulaire. Ainsi, Fc γ RIA et Fc γ RIIA activent NF- κ B dans les polynucléaires neutrophiles (Tsitsikov et al., 1995).

4. Récepteurs Fc γ et applications thérapeutiques

Les récepteurs Fc (FcRs) sont des molécules clés du système immunitaire puisqu'elles contrôlent l'activité biologique de l'effecteur majeur de la réponse humorale, l'anticorps (Daeron et Lesourne, 2006). L'interaction de l'IgG avec son récepteur Fc γ R, Fc-Fc γ R, dans la réponse induite par l'anticorps est critique et a été démontrée dans plusieurs modèles cellulaires (Clynes, 2006). Comme conséquence de cette interaction, la cellule cible opsonisée est éliminée par les cellules effectrices de l'immunité (réponse ADCC).

A l'heure actuelle, la thérapie par des anticorps monoclonaux dans le traitement du cancer suggère que la mort de la cellule tumorale est obtenue au travers de l'interaction Fc-Fc γ R. C'est le cas du traitement des lymphomes malin non-Hodgkiniens. L'anticorps anti-CD20, le Rituximab®, a été le premier anticorps monoclonal validé en thérapie. Il est amplement utilisé en association avec une chimiothérapie standard (CHOP) dans les lymphomes folliculaires, le lymphome à cellules du manteau et les lymphomes à grandes cellules B (DLBCL) (Coiffier, 2006). Son effet anti-tumoral sur des cellules de lymphomes malins met en jeu l'activation des récepteurs activateurs (Fc γ RI et Fc γ RIIIA) au niveau des cellules effectrices (NK, monocytes et macrophages) en déclenchant de mécanismes d'ADCC. En effet, Clynes et al ont décrit dans un modèle murin, que l'administration de cet anticorps permet une réduction significative du volume tumoral en quelques semaines. L'élimination des cellules tumorales est réalisée par les macrophages suite à l'activation de Fc γ RIIIA. La délétion de la chaîne γ (souris FcR γ -/-) entraîne une diminution très nette de l'effet anti-tumoral. De façon similaire, la mutation des domaines CH2/CH3 du fragment Fc (empêchant sa fixation au Fc γ R) entraîne une diminution nette de l'efficacité de l'anticorps. A l'inverse, la délétion de Fc γ RIIB accentue l'efficacité thérapeutique de l'Ac mettant en évidence la possibilité d'une régulation négative in vivo, de la cytotoxicité anti-tumorale par Fc γ RIIB (Clynes et al., 2000). Ces résultats soulignent l'intérêt de concevoir des anticorps liant de façon préférentielle les récepteurs à motif ITAM, afin d'optimiser leur efficacité thérapeutique, au niveau des cellules effectrices. Cependant, Camilleri-Broët et al., ont décrit que l'expression de Fc γ RIIB ne modifie pas l'efficacité du rituximab, dans le cas de DLBC (Camilleri-Broët et al., 2004a).

Récemment, Rankin et al., ont développé des anticorps monoclonaux chimères et humanisés spécifiques de la région extracellulaire de Fc γ RIIB (CD32B), ch2B6 et hu2B6-3.5. Ces anticorps

n'induisent pas la mort cellulaire des lymphocytes B, mais ils sont capables d'induire la cytotoxicité cellulaire induite par anticorps (ADCC) contre les lignées tumorales B. Dans un modèle de greffe xénogénique de lymphome B humain, l'administration de 2B6 entraîne la diminution de la croissance tumorale. Cette activité nécessite une région Fc intacte. De plus, 2B6 est capable d'inhiber l'interaction des ICs avec Fc γ RIIB. Ceci indique que le blocage du récepteur pourrait augmenter les fonctions cellulaires effectrices et favoriser la réponse anti-tumoral (Rankin et al., 2006). Ce travail suggère que le récepteur Fc γ RIIB représente une nouvelle approche dans l'immunothérapie des maladies lymphoprolifératives B. L'engineering de l'anticorps est une approche qui permettra d'explorer ces nouvelles stratégies thérapeutiques.

Actuellement, les stratégies thérapeutiques visant la diminution de l'expression des récepteurs Fc activateurs et l'augmentation de l'expression du récepteur Fc γ RIIB semblent être déjà très efficaces dans le traitement de maladies auto-immunes. C'est le cas du traitement du Purpura thrombocytopenique idiopathique (ITP) auto-immun par l'administration intraveineuse d'IgG (IVIG) (Samuelsson et al., 2001 ; Crow et al., 2003).

L'exploitation des nouvelles approches thérapeutiques au sein des cellules dendritiques semble être très prometteuse pour le développement de la vaccination et de l'immunothérapie. Il a été décrit que le blocage de l'association des ICs avec Fc γ RIIB dans ce type cellulaire semble être suffisant pour générer une réponse immune plus efficace, une fois que ce blocage a conduit à la maturation des DCs (Nimmerjahn et Ravetch, 2006)

La recherche dans la biologie des récepteurs Fc γ durant la dernière décennie a permis de démontrer le rôle de ce récepteur dans les différentes phases de la réponse immune. Les connaissances actuelles sur les facteurs génétiques et acquis (Figure 23) dans la régulation de l'expression et de la fonction du récepteur Fc γ RIIB permettront encore le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques.

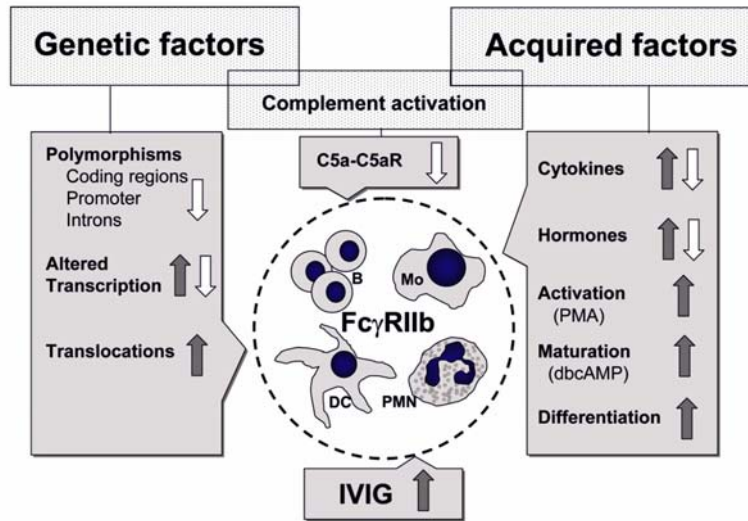


Figure 24. Les facteurs génétiques et acquis dans la régulation de l'expression et de la fonction du récepteur Fc γ RIIb. D'après Stefanescu et al., 2004.

5. Conclusions

Depuis l'identification des récepteurs cellulaires pour immunoglobulines grâce aux premières approches immunologiques, les études sur la biologie de ces récepteurs ont permis de mettre en évidence leur rôle dans les phases afférentes et efférentes de la réponse immune. Il existe deux classes de récepteurs capables de reconnaître le fragment Fc de l'IgG : les récepteurs activateurs et les récepteurs inhibiteurs. Les récepteurs humains activateurs Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIII sont impliqués dans les processus biologiques tel que la phagocytose, cytolysse, la dégranulation et l'activation transcriptionnelle de gènes pour les cytokines, capables d'initier une cascade inflammatoire. Le seul récepteur inhibiteur, Fc γ RIIB, est un régulateur négatif des processus cellulaires comme, la prolifération lymphocytaire B, la phagocytose par macrophages et la dégranulation de mastocytes. De plus, les récepteurs activateurs et inhibiteurs peuvent être co-exprimés par la même cellule, ce qui rajoute un niveau de complexité dans la compréhension de leurs fonctions. La diversité des récepteurs pour le fragment Fc des Immunoglobulines G, l'hétérogénéité retrouvée dans l'expression tissulaire, au niveau moléculaire et protéique, ainsi que leur modulation par les cytokines inflammatoires reflète, de cette façon, une activité fonctionnelle complexe au sein de l'immunité cellulaire. Différentes approches expérimentales ont permis d'identifier implication de Fc γ RIIB dans le développement des maladies auto-

immunes. Des nombreux arguments sont en faveur du rôle de Fc γ RIIB dans l'oncogenèse, cependant les mécanismes ne sont pas encore élucidés. Bien qu'il soit nécessaire de procéder à des études complémentaires sur la biologie de ces récepteurs, il semble que la modulation de la fonction de ce récepteur inhibiteur soit une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement des maladies autoimmunes et lymphoprolifératives. La fonction la plus connue des récepteurs Fc γ RIIB est le contrôle négatif de la prolifération des cellules B par son association avec le BCR. D'autre part, le recrutement des récepteurs Fc γ RIIB induit un processus de mort cellulaire encore très peu étudié chez l'homme. La mort cellulaire programmée ou apoptose fait ainsi l'objet de la troisième partie de ce travail.

III. MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE OU APOPTOSE

1. Généralités sur l'apoptose

1.1. Définition

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort.

La mort cellulaire a été observée et comprise depuis le XIX^e siècle sans démonstration expérimentale jusqu'à la moitié du XX^e siècle. Au début des années 60 fut démontré que la mort cellulaire était contrôlée naturellement (programmée) et que les manifestations en sont communes à plusieurs types de mort cellulaires mais difficiles à expliquer, en particulier dans le cas de l'apoptose. Durant 1990 les bases génétiques de la mort cellulaire ont été établies et les premiers éléments de la machinerie de la mort cellulaire (caspase 3, bcl-2 et Fas) ont été identifiés, séquencés et reconnus comme étant extrêmement conservés au cours de l'évolution. Le développement rapide de la recherche dans ce domaine a livré une bonne compréhension de la façon dont la mort cellulaire s'accomplit. Neuf types distincts de mort cellulaire ont été décrits, parmi lesquels huit sont génétiquement programmés (Tableau 2).

	Nécrose	Apoptose	Apoptose Caspase indépendante	Auphagocytose	WD	Exitotoxicité	Erythro- poïese	Plaquettes	Kératinisation
Programme génétique	aucun	oui		oui	oui	oui	oui	oui	oui
Membrane	lysée	intacte exposition PS	intacte exposition PS	intacte exposition PS		intacte	intacte	intacte	intacte
Organites	lysés	intacts	intacts	Intacts réassemblage lipidique		intacte	intacte	intacte	crosslinked réassemblage lipidique
Mitochondries	gonflées	intactes	intactes				perdues		perdues
Noyau		chr.condens. fragm.ADN	chr.condens. fragm.ADN	chr.condens. fragm.ADN			perdu	perdu	perdu
Enzymes	aucunes	caspases	? calpaïnes	Lysosomiaux beclin1	VPR	calpaïnes NCX	calpaïnes		TG 1,3,5
Récepteurs		Récept.de mort							
Régulateurs		Famille Bcl IAP				calcium	GATA2		AP1 calcium
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Tableau 2. Neuf types distincts de mort cellulaire décrits, huit sont génétiquement programmés. D'après Ameisen et al., 2005.

Dans la troisième partie de ce travail nous nous focaliserons sur la description de la mort cellulaire programmée ou apoptose. L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée (MCP) très bien caractérisée par l'activation d'une famille spécifique des cystéines protéases, les caspases, suivi d'un certain nombre de modifications morphologiques dépendantes des caspases comme le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine, et la fragmentation cellulaire permettant sa phagocytose par les cellules voisines en évitant une réponse inflammatoire. (Kerr et al., 1972; Ferri and Kroemer, 2001; Kaufmann and Hengartner, 2001, Jäättelä, 2004).

1.2. Rôles de l'apoptose

L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Elle joue un rôle essentiel dans le développement normal de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez l'adulte. Elle est impliquée dans le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Elle participe notamment à l'élimination de cellules surnuméraires, lors du développement embryonnaire. En ce qui concerne le système immunitaire, l'apoptose participe à la sélection négative en éliminant les lymphocytes T et B auto-réactifs ainsi que les lymphocytes T et B qui ne montrent pas une affinité suffisante pour l'antigène (Krammer et al., 1994 ; Matiba et al., 1997). Plus de 90% des lymphocytes meurent au cours de cette sélection. L'apoptose permet aussi l'élimination des cellules infectées par des virus ainsi que les cellules tumorales.

Etant donné l'importance biologique de l'apoptose, il est certain que des dérèglements de ce processus ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies (Follezou et al. 1999). Une résistance pathologique des cellules à l'apoptose entraîne l'apparition de maladies comme les cancers ou syndromes lymphoprolifératifs ; à l'inverse, un excès d'apoptose participe à l'émergence de maladies neurodégénératives ou de syndromes d'immunodéficiences comme le SIDA (Groux H et al., 1991 ; Mapara et al., 1993 ; Fisher., 1994 ; Griffith et al.,1995).

1.3. Description de l'apoptose

1.3.1. Caractéristiques morphologiques

Les altérations morphologiques observées dans une cellule en apoptose sont les conséquences d'une série d'évènements moléculaires et biochimiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire. La réduction du volume cellulaire est un des premiers changements observables: la cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui résulte en une modification de la forme et de la taille cellulaire. Au cours de cette étape, la cellule perd le

contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose.

Des modifications nucléaires sont également observées. La chromatine se condense à la périphérie de la membrane nucléaire ; ensuite l'enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques, entourés de membrane plasmique. Ces vésicules se détachent de la cellule pour former les corps apoptotiques, qui sont libérés dans le milieu. Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus. En effet, la formation de corps apoptotiques avec une membrane plasmique intacte prévient la libération des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire (Kerr, 1972).

Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose (Figure 24) (Ziegler et Groscurth, 2004). La nécrose survient accidentellement lorsque la cellule a subi des dommages importants, tel que l'exposition à de très fortes doses d'agents cytotoxiques. La mort nécrotique est ainsi la conséquence passive d'une agression de la cellule caractérisée par une perméabilisation membranaire précoce et un gonflement de la cellule, suivi par la rupture de la membrane plasmique. Les constituants cytoplasmiques sont alors libérés dans le milieu extracellulaire et sont à l'origine d'une réaction inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, au cours de la nécrose, la chromatine n'est pas fragmentée mais lysée (karyolysis). De plus, les organites cellulaires sont détruits.

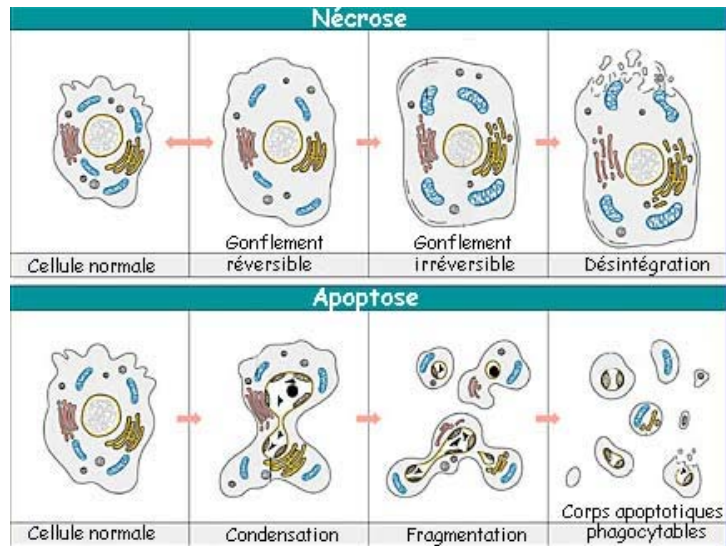


Figure 25. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.
 D'après : www.lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html

1.3.2 Caractéristiques biochimiques

Les altérations morphologiques produites lors de l'apoptose sont accompagnées d'altérations biochimiques spécifiques. Parmi celles-ci, la plus remarquable est la fragmentation de l'ADN, qui survient lors de la condensation de la chromatine. En effet, l'ADN est digéré en des endroits précis en deux étapes. La plus précoce génère des fragments de 50 à 300 kb qui peuvent s'expliquer par l'excision de boucles d'ADN et de leurs oligomères (Oberhammer et al., 1993). La seconde étape donne des fragments d'ADN dont le poids moléculaire correspond à 180-200 paires de bases (nucléosomes) ou à des multiples de cette unité de base (oligonucléosomes), donnant un profil électrophorétique caractéristique «en échelle» dans un gel d'agarose (Wyllie, 1980).

Il a été proposé qu'une ou plusieurs endonucléases participent à la fragmentation de l'ADN (Wyllie, 1980). Plusieurs études ont démontré que l'endonucléase CAD/DFF40 est responsable de ce clivage internucléosomal (Enari et al. 1998, Liu et al. 1997). En effet, dans les cellules déficientes en CAD/DFF40 cette fragmentation endogène n'est pas observée. CAD/DFF40 forme un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD/DFF45. Lors de l'apoptose, la caspase-3 est capable de cliver ICAD/DFF45 permettant la dissociation de CAD/DFF40 ce qui libère

l'endonucléase active, qui se dirige vers le noyau (Sakahira et al. 1998, Tang et Kidd 1998). La DNase II, enzyme présente dans les macrophages, est une autre nucléase responsable de la dégradation de l'ADN lors de l'apoptose (Ferri et Kroemer 2000). Elle participerait au moment de la phagocytose des corps apoptotiques, initiée par les macrophages, en association avec d'autres enzymes du lysosome, comme les cathepsines (Wu et al. 2000 ; McIlroy et al. 2000).

Une autre caractéristique biochimique importante de l'apoptose est la perte de l'asymétrie phospholipidique de la membrane plasmique. Les membranes des cellules normales viables présentent beaucoup de phosphatidylcholines et de sphingomyélines sur le feuillet externe de la membrane alors que le feuillet interne contient la plupart des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines. L'entrée en apoptose conduit à une perte de cette asymétrie et en particulier à une exposition des phosphatidylsérines à la surface externe de la membrane cellulaire (Martin et al., 1996). Ce phénomène très rapide est l'un des mécanismes de reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages, ceci par l'intermédiaire d'un récepteur aux phosphatidylsérines (Devitt et al., 1998 ; Fadok et al. 2000). D'autre part, d'autres récepteurs à la surface du macrophage sont impliqués dans la reconnaissance de la cellule en apoptose. Il s'agit de la glycoprotéine CD14 qui interagit avec les phosphatidylsérines (Devitt et al., 1998), l'intégrine (Savill et al., 1990) et la protéine DOCK 180, qui provoque l'extension de la surface du phagocyte (Wu et Horvitz, 1998). Fait essentiel, les corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages en absence de réaction inflammatoire (Kerr et al., 1972).

D'autres modifications ont été relatées comme la modification de récepteurs membranaires, l'activation de pompes dépendantes de l'ATP et l'augmentation du calcium intracellulaire associés à la dégradation des certaines protéines cellulaires, comme les lamines formant la membrane nucléaire ou la fodrine et la gelsoline dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette conduisant à la vésiculation membranaire.

1.3.3. Caractéristiques mitochondriales

Il a été montré que les mitochondries jouent un rôle considérable dans la phase d'exécution et dans la régulation du processus apoptotique (Kroemer et al., 1995; Zamzami et al., 1995b). Au cours de l'apoptose le potentiel de membrane mitochondrial diminue dans de nombreux types cellulaires, et de façon indépendante du stimulus (Zamzami et al., 1995a; Zamzami et al.,

1995b). Cette diminution se produit avant la fragmentation de l'ADN et la perte de l'asymétrie phospholipidique au niveau de la membrane plasmique, suggérant qu'elle constitue un événement précoce du processus apoptotique (Kroemer et al., 1997).

Des études réalisées dans des systèmes acellulaires montrent que la rupture du potentiel mitochondrial est corrélée à l'ouverture du mTP (mitochondrial permeability transition pore) qui provoque la libération dans le cytoplasme de différents facteurs pro-apoptotiques (Green and Reed, 1998; Liu et al., 1996). De plus, l'utilisation de substances inhibitrices des du mTP inhibe complètement la rupture du potentiel mitochondrial. Ces travaux suggèrent que la rupture du potentiel mitochondrial induite par les PT est un événement précoce et irréversible de la phase d'exécution du processus apoptotique.

1.4. Les principaux effecteurs de l'apoptose

Grâce aux travaux de Robert Horovitz concernant la mort cellulaire chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les différents gènes contrôlant ce phénomène ont été identifiés. L'analyse génétique de différents mutants a permis de mettre en évidence trois gènes clés impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée: CED-3, CED-4 et CED-9, CED pour *C. elegans* death (Hengartner et Horvitz 1994). Cette étude a mis en évidence que les produits des gènes CED-3 et CED-4 sont nécessaires pour le déroulement de l'apoptose, la protéine CED-3 étant une protéase et la protéine ced-4 une molécule pro-apoptotique pouvant se lier à CED-3. Contrairement, la protéine traduite à partir du gène CED-9 présente une fonction antagoniste à CED-3 et CED-4 et est capable d'inhiber l'apoptose. Postérieurement, d'autres analyses génétiques ont permis d'identifier chez les mammifères les homologues de ces gènes ayant des rôles similaires dans la régulation de l'apoptose.

Les homologues de CED-3 codent pour une famille de protéases à cystéine dénommées caspases (Nicholson et Thornberry, 1997). Ces enzymes, en réponse à un stimulus apoptotique, sont activées en cascade aboutissant par clivage protéolytique à l'activation de protéines impliquées dans le processus apoptotique (pro-caspases et endonucléases), mais aussi impliquées dans la destruction de protéines impliquées dans l'organisation structurale (actine et lamines), dans la régulation de la réparation de l'ADN (PARP et DNAPK) ou dans la régulation du cycle cellulaire (RB).

Les homologues de CED-9 codent pour une douzaine de protéines appartenant à la famille des protéines Bcl-2 (Korsmeyer, 1992). Il a été montré que certaines de ces protéines comme Bcl-2 et Bcl-xL sont impliquées dans la survie de la cellule. D'autres partenaires, telle que la protéine Bax qui est un homologue de EGL-1, sont impliqués dans la mort cellulaire induite par un grand nombre de stimuli intra ou extracellulaires (Korsmeyer, 1992). Tous les membres de cette famille de protéines présentent des analogies structurales et elles sont capables de former des homo ou hétérodimères. Le rapport entre le niveau de protéines anti et pro-apoptotiques semble déterminer, en partie, la sensibilité de la cellule à l'apoptose (Oltvai et al., 1993). L'analogue de CED-4 est la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) (Zou et al., 1997). Cette protéine initie l'apoptose en activant les caspases. En effet, Apaf-1, le cytochrome-c et la pro-caspase-9, en présence d'ATP, interagissent, entraînant l'activation de la pro-caspase-3 (Chinnaiyan et al., 1997) (Figure 26). Aussi, l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (ICE) des mammifères présente des homologies avec CED-3 et sa surexpression est capable d'induire l'apoptose dans les cellules de mammifères (Yuan et al., 1993).

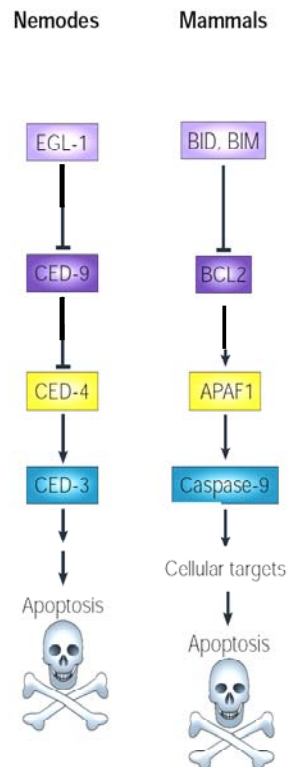


Figure 26. Apoptose chez C. Elegans et chez les mammifères. Adaptée de Riedl et Shi, 2005

1.4.1. Les caspases

Classification et structure des caspases

Les caspases sont les composants essentiels de la plupart des voies conduisant à la mort de la cellule par apoptose. Elles sont présentes constitutivement dans la cellule et sont hautement conservées à travers les espèces (Boyce et al. 2004). La détermination de la séquence de CED-3 a permis d'identifier une protéine analogue chez les Mammifères : ICE (enzyme de conversion de l'IL-1 beta)/caspase-1 (Yuan et al., 1993). Cette homologie de séquence a permis d'identifier et de classer quatorze caspases, dont onze sont présentes chez l'homme. Ces enzymes possèdent des analogies au niveau de leur séquence en acides aminés, leur structure et leur substrat. Les analyses phylogénétiques ont permis de les classer en trois sous-familles : la sous-famille ICE (caspases-1, -4, -5, -11, -12 et -13), la sous-famille CED-3/ CPP32 (caspases-3, -6, -7, -8, -9 et -10) et la sous-famille ICH-1 (caspase-2) (Nicholson and Thornberry, 1997) (Figure 27A). Les caspases-11 et -12 sont des homologues des caspases-4 et -5 chez la souris, et la caspase-13 est un homologue bovin de la caspase-4 (Koenig et al. 2001). Cependant, il a été décrit une « pseudo-caspase-12 » chez l'homme (Lamkanfi et al. 2004). Toutes ces caspases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat.

Sur le plan structural, les caspases sont exprimées sous la forme de zymogène (précurseurs inactif) ou procaspases (30 à 50 kD), contenant trois domaines : un pro-domaine, localisé dans l'extrémité N-terminale, une grande sous-unité (17 à 22 kD) et une petite sous-unité (10 à 12 kD) (Figure 27B). Le pro-domaine est de longueur variable (23 à 126 acides aminés) et contribue à la régulation de ces enzymes (Van Crielinge et al., 1996). Selon leur taille, on distingue les caspases à pro-domaine long (caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9 et -10) et les caspases à pro-domaine court (caspases-3, -6 et -7).

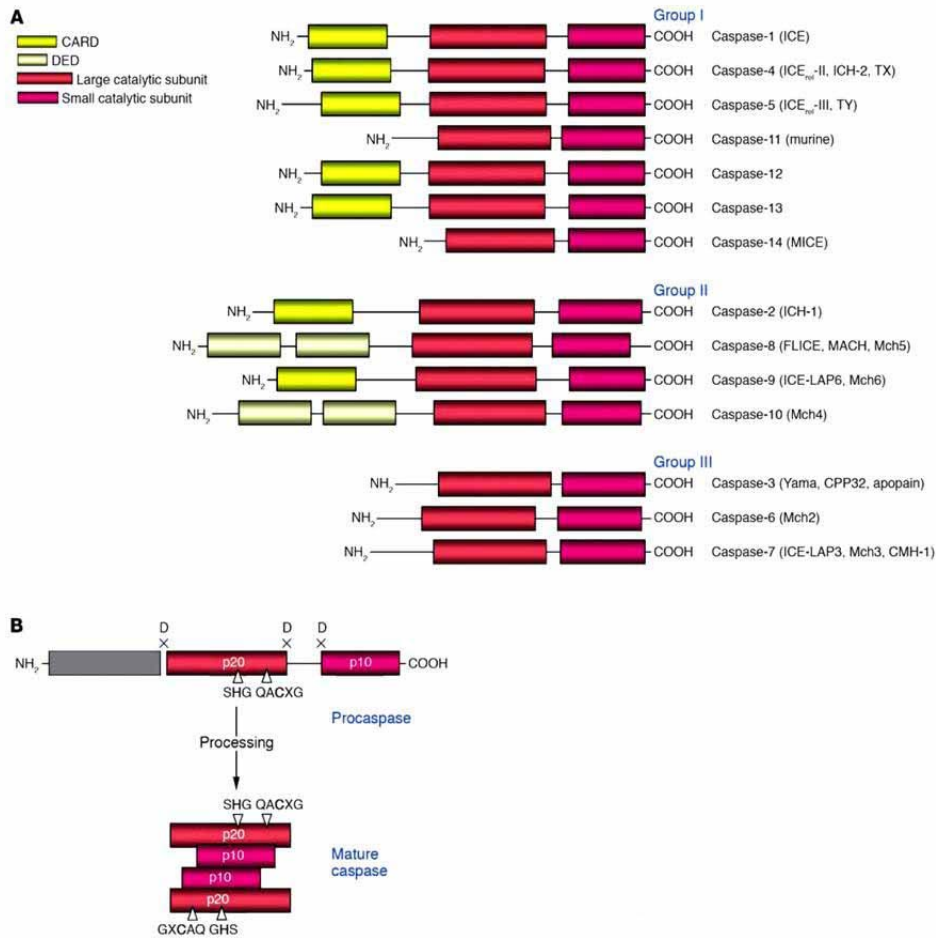


Figure 27. La structure de caspases. (A) La classification des caspases. Le groupe I représente les caspases inflammatoires ; le groupe II, les caspases initiatrices et le groupe III, les caspases effectrices. (B) Schéma d'activation des caspases. *D'après Lavrik et al., 2005*

La grande sous-unité de toutes les caspases porte un site catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence de type QAXG (X étant R, Q ou G), leur conférant une spécificité de clivage au niveau d'un résidu aspartate en position P1. Les acides aminés qui composent la partie qui participe à la reconnaissance du substrat au niveau d'un résidu aspartate en position P1, sont aussi très conservés. Par contre, les acides aminés de la partie qui participe à la fixation des résidus en position P2-P4, divergent et sont responsables de la spécificité de substrat pour chaque caspase (Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry, 1997). Sur la base de cette spécificité, les caspases peuvent être classées en deux groupes avec des fonctions biologiques différentes (Nicholson et Thornberry, 1997).

Le premier groupe comprend les caspases-1, -4 et -5 qui participent principalement à l'inflammation. Leur substrat est caractérisé par la séquence WEHD. La caspase-14 est aussi une caspase « non apoptotique », puisqu'elle intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme (Mikolajczyk et al., 2004).

Le deuxième groupe comprend les caspases apoptotiques divisées en initiatrices et effectrices (Figure 27A). Les caspases initiatrices comprennent les caspases-2, -8 -9 et -10. Elles possèdent généralement un long prodomaine contenant un des deux motifs caractéristiques : DED (caspases-8 et -10) ou CARD (caspases-9 et -2) permettant l'interaction avec d'autres protéines ce qui résulte en leur activation. Ainsi, les caspases initiatrices activent les caspases effectrices -3, -6 et -7, caractérisées par un prodomaine de petite taille, qui à leurs tour, clivent un certain nombre de protéines dans la cellule. Ainsi les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices.

L'activation des caspases

L'activation des caspases est réalisée par différents mécanismes (Boatright et Salvesen 2003, Thornberry et Lazebnik 1998). Le mécanisme de transactivation consiste en l'activation des caspases par d'autres caspases. Ce mécanisme est utilisé pour l'activation des caspases effectrices par les caspases initiatrices et est à l'origine de la cascade de caspases permettant l'amplification du signal apoptotique. En utilisant des systèmes de régulation rétroactifs, les caspases effectrices peuvent aussi activer d'autres caspases (Van de Craen et al., 1999). Les caspases peuvent être également activées par autoactivation. Cette activation peut être due à l'induction d'un rapprochement entre plusieurs procaspases par des interactions avec des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique favorisant ainsi leur autoactivation (Muzio et al., 1998). C'est le cas de la caspase-8 lors de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Algeciras-Schimnich et al., 2002). La pro-caspase-8 qui possède un long pro-domaine est capable d'interagir avec des protéines qui vont s'associer avec le domaine intra-cytoplasmique de récepteurs de membrane et ainsi recruter les pro-caspases-8 à proximité les unes des autres. Cette interaction induit l'oligomérisation des pro-caspases-8 et leur activation par un mécanisme d'auto-protéolyse. Les caspases-10 et -2 sont activées de façon similaire. L'activation des caspases initiatrices peut aussi résulter d'une association avec une sous-unité

régulatrice. Ceci été observé pour la caspase-9. Le clivage protéolytique de cette caspase n'est pas suffisant pour son activation. En effet, cette dernière nécessite l'interaction avec le cofacteur Apaf-1 (Rodriguez et Lazebnik, 1999): Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome, constitué de la caspase-9, d'Apaf-1 et du cytochrome c (pour revue Schafer et Kornbluth, 2006). La formation de ce complexe s'effectue suite à la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytoplasme (Figure 28). Le cytochrome c se lie à l'extrémité C-terminale de la protéine Apaf-1, conduisant à un changement conformationnel d'Apaf-1 et par conséquent son activation. Cette activation induit à une augmentation de son affinité par dATP/ATP (Wang, 2001) permettant l'oligomérisation de sept sous-unités d'Apaf-1 et recrutement par leur domaine CARD de plusieurs procaspases-9 qui vont alors être activées (Srinivasula et al., 1998 ; Saleh et al., 1999 ; Acehan et al., 2002). Cette activation de la procaspase-9 est due à sa dimérisation (Pop et al., 2006). En effet, Apaf-1 contient à son extrémité N-terminale, un domaine CARD qui est exposé lors de son changement de conformation (Zhou et al., 1999). L'apoptosome représente, ainsi la forme active de la caspase-9 (Rodriguez et Lazebnik, 1999) qui est capable de cliver et d'activer les procaspases-3 et -7 qui exécuteront, à leur tour, le programme de mort cellulaire (Li et al., 1997).

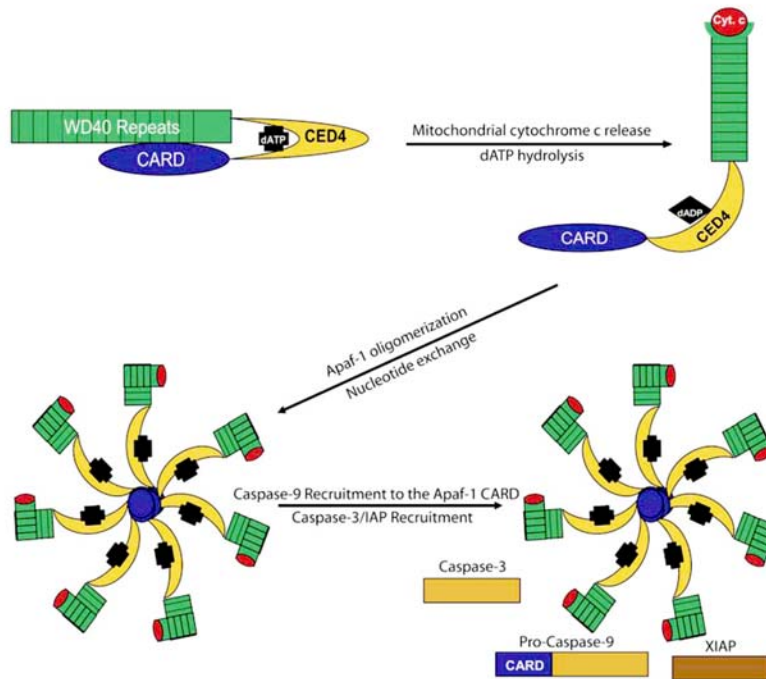


Figure 28. Formation de l'apoptosome. D'après Schafer et Kornbluth, 2006

Les cibles des caspases

De nombreuses protéines sont spécifiquement clivées par les caspases-3, -6 et -7 pendant le processus apoptotique (Degterev et al., 2003). Le premier substrat identifié est l'enzyme poly-ADP-ribose polymérase (PARP) qui participe à la réparation de l'ADN (Kaufmann et al., 1993). Le clivage de cette enzyme au niveau de la séquence DEVD-G est l'une des premières caractéristiques détectables pendant l'apoptose. Plus de 100 substrats différents ont été décrits (Figure 29). Dans la plupart des cas, le clivage de la protéine cible conduit à son inactivation entraînant la perte de son activité biologique. En effet, le clivage des protéines anti-apoptotiques comme les inhibiteurs de caspases FLIP et IAP (Liston et al., 2003) ou les protéines BCL-2 ou BCL-XL, résulte en la conversion de ces protéines en facteurs pro-apoptotiques (Cheng et al., 1997). D'autres protéines qui participent à la régulation de la réparation de l'ADN sont clivées: la sous-unité catalytique de la protéine kinase DNA-dépendante (DNA-PKcs), le composant de 140 kD du complexe C de réplication de l'ADN. Les caspases sont aussi responsables de la protéolyse de protéines de régulation du cycle cellulaire (Jin et al., 2000) ainsi que de protéines de transduction de signaux comme AKT qui une fois clivée, n'exerce plus sa fonction de facteur de survie (Widmann et al., 1998). Par ailleurs, les caspases peuvent induire un gain de fonction

de certaines protéines pro-apoptotiques, soit directement, comme les caspases elles-mêmes ou la protéine BID qui n'est active qu'après clivage, soit indirectement par dissociation de domaines régulateurs ou inhibiteurs comme la libération de l'inhibiteur ICAD/DFF45, libérant à son tour l'endonucléase CAD/DFF40 active (Tang et Kidd, 1998). De plus, les caspases sont à l'origine de la dissociation de certains constituants cellulaires par clivage de protéines de structure. En effet, il a été décrit que la caspase-6 conduit à l'altération de la membrane nucléaire par la dégradation de lamines nucléaires (Ruchaud et al., 2002) ainsi que le clivage des protéines constituant les filaments intermédiaires comme la kératine 18 (Schutte et al., 2004) ou encore par activation de la gelsoline clivée par la caspase-3 conduisant à la dépolymérisation de l'actine (Kothakota et al., 1997). Des protéines des jonctions adhérentes, assurant les interactions entre les cellules sont également dégradées par les caspases (β -caténine) (Brancolini et al., 1998). De cette façon, la protéolyse de tous ces substrats produit globalement une altération de la réparation de l'ADN (PARP ou DNA-PKcs), l'arrêt du cycle cellulaire (PKC et RB) et la perte de l'intégrité cellulaire (actine, lamine et fodrine) aboutissant à la destruction complète de la cellule.

Caspase substrates			
<u>1) Apoptotic and inflammatory regulators</u>			
<i>Proapoptotic</i>	<i>Antiapoptotic</i>		<i>Inflammatory molecules</i>
Bid	Bcl-2	RIP	IL-1 β
Caspases	Bcl-xL	p65/RelA	IL-18
DFF45	FLIP _L	IKK β	IL-16
p28 Bap31	XIAP	cIAP-1	
<u>2) Protein kinases and other signal transduction regulators</u>			
DNA-PK	MEKK1	FAK	Akt
Raf-1	Mst1	Mst2	SIK
PITSLRE p110	PITSLRE p170	PKN	PRK2
Fyn	Wee1	SRPK1	SRPK2
CaMK IV	CaMK II α	CaMKK	ROCK 1
IKK β	RIP	PKC θ	PKC δ
PKC μ	PKC ζ	SPAK	PP2A
RasGAP	Cbl	Cbl-b	ZAP-70
<u>3) Cytosolic and nuclear structural proteins</u>			
α -fodrin	actin	Gas-2	gelsolin
Beta II-spectrin	β -Catenin	Cytokeratin 18	NuMA
Lamin A	Lamin B	Lamin C	DNA pol. I
HnRNP proteins C1 and C2		70-kDa protein of U1 snRNP	
topoisomerase I and II		UBF	
<u>4) Repair factors</u>			
PARP	DNA-PK	Rad51	ATM
Rad9			
<u>5) Cell cycle regulators</u>			
p27	p21	Rb	Mdm2
Cdc27	Wee1		
<u>6) Disease related factors</u>			
huntingtin	ataxin-3	androgen receptor	atropin-1
APP			

Figure 29. Les principaux substrats des caspases. D'après Degterev et al., 2003

La régulation des caspases

Les précurseurs des caspases sont exprimés de façon constitutive dans la cellule et leur activation peut se produire très rapidement. Le fait que l'activation inappropriée des caspases puisse engendrer des dommages très importants implique que leur activation soit extrêmement contrôlée. Ainsi la régulation des caspases est effectuée à plusieurs niveaux.

L'étude de l'inhibition de l'apoptose par certains virus dans leurs cellules hôtes a permis d'identifier différents inhibiteurs spécifiques des caspases. Trois classes ont été décrites : Cytokine réponse modifier A (CrmA) (Ray et al., 1992), p35 (Bump et al., 1995), la famille des inhibiteurs IAP (inhibitors of apoptosis) (Uren et al., 1998) et la famille d'inhibiteurs de FLICE, FLIP (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme_like protease [FLICE/caspase8]-inhibitory) (Thome et al., 1997).

CrmA est une protéine de 38 kD qui appartient à la famille des inhibiteurs des sérine-protéases (seprines) (Ray et al., 1992). Cette protéine est codée par le cowpox virus et inhibe les caspases-1 et -3, mais cette dernière de façon moins efficace (Nicholson et al., 1995). Des études plus récentes ont montré que CrmA est capable aussi d'inhiber fortement la caspase-8 (Zhou et al., 1997), mécanisme par lequel elle inhibe l'apoptose induite par la voie CD95.

La protéine p35 synthétisée par le baculovirus est un inhibiteur général des caspases. Il a été montré in vitro qu'elle inhibe l'apoptose par liaison directe avec les caspases-1, -2, -3 et -4 activées, dans des cellules d'insectes, de *C. elegans* et de Mammifères (Bump et al., 1995; Xue and Horvitz, 1995). Cependant, jusqu'à présent l'équivalent de p35 n'a pas été identifié chez les Mammifères.

En ce qui concerne la famille IAP, découverte initialement chez le baculovirus, tous les membres (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin, Ts-IAP, NAIP) portent une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (Liston et al., 2003). Ils inhibent les caspases effectrices comme la caspase-9 ainsi que les caspases initiateurs, les caspases-3 et -7. De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine induisant leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées (Yang et Li, 2000, Suzuki et al., 2001). Ces inhibiteurs sont à leur tour, contrôlés par les protéines

SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2. Celles-ci sont capables de se lier aux IAP et les inhiber lorsque elles sont libérées de la mitochondrie dans le cytoplasme durant le processus d'apoptose (Du et al., 2000 ; Liston et al., 2003).

Les inhibiteurs FLIP peuvent interagir directement au niveau des récepteurs de mort avec les protéines adaptatrice Fadd ou la caspase 8 grâce à leur homologie structurale avec la procaspase-8. En conséquence, l'inhibiteur va entrer en compétition avec celle-ci et bloquer soit son recrutement au niveau du complexe du récepteur de mort, soit l'activation de la caspase-8 en inhibant son clivage (Tschopp et al., 1998). Leur expression constitutive peut entraîner une résistance à l'apoptose induite par CD95 (Irisarri et al., 2000).

Les caspases peuvent être régulées au niveau transcriptionnel ainsi que par des modifications post-traductionnelles. C'est le cas de la caspase-8, huit isoformes (caspase-8 a-h) ont été identifiés. Cependant, seuls les isoformes caspase-8/a et caspase-8/b sont exprimés comme protéines dans différents types de cellules. Ces deux isoformes sont activés pendant l'apoptose induite par la voie CD95 (Scaffidi et al., 1997) et pourraient contrôler l'activité des caspases en formant des complexes hétérodimériques inactifs avec la caspase-8 agissant comme des inhibiteurs (Alnemri et al., 1995; Boldin et al., 1996). Il semble que les caspases pourraient réguler leur propre transcription et leur activité en modifiant leur niveau d'expression (King and Goodbourn, 1998; Kumar et al., 1997).

Un autre niveau de régulation est la disponibilité de cofacteur comme Fadd, le cytochrome c et Apaf-1. La protéine Fadd par son domaine DED va interagir avec le prodomaine de la procaspase-8 (Muzio et al., 1996) et ainsi permettre son autoactivation (Muzio et al., 1998). Le cytochrome c est localisé dans le compartiment mitochondrial, ce qui empêche le contact des procaspases avec ce cofacteur. C'est alors, au cours de l'apoptose que le cytochrome c sera libéré dans le cytosol et ainsi contribuer à l'activation des caspases (Wang, 2001). La protéine Apaf-1, essentiel pour la formation de l'apoptosome, nécessite son domaine CARD pour se lier et activer la caspase-9 (Bao et Shi, 2006).

Des inhibiteurs peptidiques pour les caspases ont été développés (Thornberry et al., 1994). Ces inhibiteurs sont basés sur la spécificité du térapeptide du site de reconnaissance du substrat de chaque caspase (Wei et al., 2000). L'introduction au niveau de l'extrémité C-terminale de ce térapeptide d'un groupement aldéhyde ou d'un groupement méthylcétone permet la synthèse

d'un inhibiteur respectivement réversible ou irréversible (Garcia-Calvo et al., 1998). Ces inhibiteurs sont largement utilisés pour démontrer l'implication des caspases et de l'apoptose dans certains processus.

1.4.2. La famille de protéines BCL-2

La translocation t(14;18) dans le lymphome folliculaire (Chapitre I, paragraphe 3.1.3.) a identifiée l'expression constitutive du gène BCL2 qui conduit à la dérégulation de l'expression de la protéine BCL2 impliquée dans le contrôle de l'apoptose. La découverte d'autres protéines homologues de BCL-2 a permis l'identification de toute une famille de protéines pro- ou anti-apoptotiques (Cory et al., 2003).

Chez les mammifères, la famille BCL-2 comprend environ vingt membres, qui possèdent tous au moins un des quatre motifs conservés : BH1 à BH4 (BCL-2 homology domain). En fonction de leur rôle biologique et la présence des domaines BH, on distingue les membres anti-apoptotiques, qui constituent la sous-famille BCL-2 et les membres pro-apoptotiques, subdivisés en deux groupes: la sous-famille BAX et la sous-famille BH3 (Figure 30).

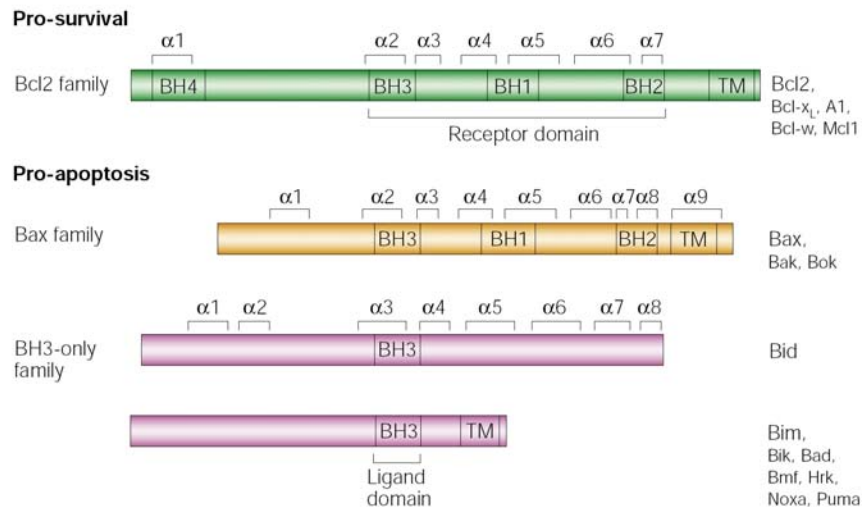


Figure 30. Classification et structure de membres de la famille BCL-2. Les régions en hélices α et les domaines BH sont indiquées. TM représente le domaine transmembranaire. D'après Cory et Adams, 2002.

Les membres anti-apoptotiques

La sous-famille BCL-2 est composée par BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1 et MCL-1, qui sont des homologues fonctionnels de CED-9 de *C. elegans*. Les structures de BCL-2, BCL-XL et BCL-W sont très similaires et ils sont constitués des quatre domaines BH et d'un domaine C-terminal hydrophobe ou domaine transmembranaire (Petros et al., 2004) (Figure 31). Ce domaine transmembranaire permet leur ancrage dans les membranes et plus particulièrement la membrane externe de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe nucléaire. BCL-2 est une protéine membranaire alors que BCL-XL et BCL-W s'associent à la membrane uniquement après un signal apoptotique. Ces protéines sont capables de protéger les cellules de différents stimuli, tel que l'absence de cytokines, les radiations UV et gamma, ainsi que les drogues chimiothérapeutiques (Cory et Adams, 2003). Il semblerait que chacune de ces protéines puisse intervenir spécifiquement dans un type cellulaire donné et induire l'inhibition de l'apoptose (Droin et Green, 2004). Ainsi BCL-2 est requis pour la survie des lymphocytes, des cellules rénales et des mélanocytes (Veis et al., 1993), BCL-W pour les cellules germinales (Ross et al. 1998), BCL-XL pour les cellules neuronales et érythropoïétiques (Gonzalez-Garcia et al., 1995) et A1 pour les neutrophiles (Orlofsky et al., 2002).

Les membres pro-apoptotiques à multi-domaines

La sous-famille BAX comprend trois membres BAX, BAK et MTD/BOK qui présentent seulement les domaines BH1, BH2 et BH3 (Petros et al., 2004) avec une structure similaire à BCL-2 favorisant la survenue de l'apoptose. BAX et BAK sont exprimés dans de nombreux tissus alors que BOK est uniquement exprimé dans les tissus de reproduction (Hsu et al. 1997). BAX est une protéine monomérique cytoplasmique, alors que BAK est mitochondrial. Lors de l'apoptose, BAX subit un changement conformationnel, s'oligomérisent et s'intègrent dans la membrane mitochondriale (Nechushtan et al., 2001) et probablement dans la membrane du réticulum endoplasmique (Zong et al., 2003). L'oligomérisation de BAX semble être nécessaire pour son activité (Antonsson et al., 2000). Suite à la translocation de BAX, BAK situé dans la membrane mitochondriale change également de conformation et forme des agrégats membranaires (Mikhailov et al. 2003) facilitant la libération du cytochrome c dans le cytosol. Il a été décrit que l'inactivation de BAX peut entraîner une augmentation du nombre de cellules lymphoïdes et de

neurones (Knudson et al., 1995, Droin et Green, 2004). Ces effets sont accentués si BAX et BAK sont inhibés simultanément dans les cellules alors que l'inactivation isolée de BAK n'a pas d'effet (Rathmell et al., 2002). Ceci suggère l'existence d'une coopération fonctionnelle entre BAX et BAK (Nechushtan et al., 2001, Mikhailov et al., 2003).

Les membres pro-apoptotiques à domaine-BH3

Les membres de cette famille sont considérés comme des sentinelles de l'apoptose. Elle est constituée de plus de huit membres chez les mammifères, dont BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA, HRK, homologues de EGL-1 de *C. elegans* (Figure 30). Les protéines de cette sous-famille sont caractérisées par la présence dans leur séquence d'un seul motif BH, le domaine central BH3, qui est essentiel pour leur fonction pro-apoptotique. Certaines interviennent dans l'initiation du processus apoptotique durant le développement (Bouillet et Strasser, 2002). En effet, les rôles physiologiques de BIM et de HRK ont été mis en évidence dans le développement et l'homéostasie hématopoïétique. BIM est essentiel pour l'élimination des lymphocytes murins auto-réactifs (Bouillet et al., 1999, 2002). Son absence induit une augmentation du nombre de leucocytes pouvant provoquer une maladie auto-immune. Les membres de cette famille sont aussi impliqués dans le déclenchement de l'apoptose en réponse à certains stimuli cytotoxiques. Il semblerait qu'en fonction du type cellulaire, chaque protéine soit responsable de la transduction d'un signal de mort spécifique. En effet, BID contribue à l'apoptose des hépatocytes provoquée par les récepteurs de mort (Yin et al., 1999). De même, BAD est impliqué dans l'apoptose due à un manque de glucose (Danial et al., 2003). NOXA et PUMA interviennent dans l'apoptose induite par des agents génotoxiques (Oda et al., 2000, Yu et al., 2001).

Principaux mécanismes d'action

Les protéines pro-apoptotiques à multi-domaine BAX et BAK sont exprimées constitutivement et induisent la perméabilité de la membrane mitochondriale seulement lors d'un stimulus apoptotique et après leur activation par certaines protéines à domaine-BH3 comme décrit ci-dessus (Figure 31A). Toutes les protéines de la sous-famille BH3 se lient aux membres anti-apoptotiques et neutralisent ainsi leur fonction de survie. En vue de ces observations, une

hypothèse récente divise les protéines à domaine-BH3 en deux groupes distincts : les « direct activators » et le « de-repressors ». Le premier groupe est capable d'activer les protéines BAX et BAK directement (Figure 31B). Les protéines à domaine-BH3, BID et BIM s'associent directement avec BAX et BAK, néanmoins les protéines anti-apoptotiques inhibent cette interaction. Le deuxième groupe comprenant les protéines Noxa, BMF, HRK, BD et BIK permet l'activation BAX et BAK en séquestrant ces homologues anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-XL ou MCL-1 (Figure 31C). De plus, la protéine BID est activée directement suite à l'activation de la caspase-8. Une fois clivée, tBID la forme active de BID, interagit avec la membrane mitochondriale où il forme des homotrimères et induit la libération de protéines de l'espace intermembranaire par des mécanismes encore inconnus (Grinberg et al., 2002). BID pourrait former des canaux membranaires ou favoriser l'oligomérisation de BAX et de BAK (Eskes et al. 2000 ; Korsmeyer et al., 2000). Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 assurent la survie des cellules par le contrôle de l'activation des caspases initiatrices, comme la caspase-2, probablement en séquestrant des activateurs ou adaptateurs de ces caspases. La protéine BCL-2 contribue également au maintien de l'intégrité des organelles notamment la mitochondrie. En effet, elle empêche la libération de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie en inhibant l'oligomérisation de BAX et de BAK (Cory et Adams, 2002), ainsi que la chute du potentiel membranaire mitochondrial.

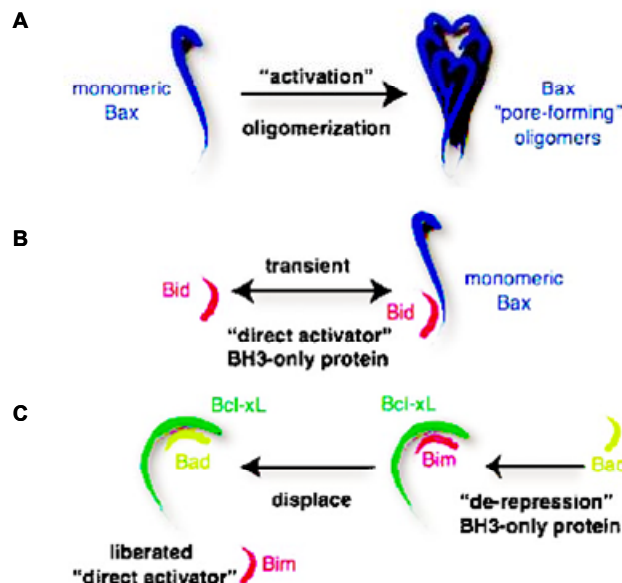


Figure 31. Mécanismes d'activation de protéines pro-apoptotiques à multi-domaines par les protéines pro-apoptotiques à domaine-BH3. (A) Oligomérisation et activation de BAX pour la formation du pore dans la membrane mitochondriale. (B) Activation directe de protéines à

domaine-BH3 par BID. (C) Activation de BIM par le « de-repressor » BAD. BAD s'associe avec BCL-xl et libère BIM pour participer du processus apoptotique. D'après Chipuk et al., 2006.

Régulation de la famille BCL-2

Les protéines de la famille BH3, exprimées constitutivement, sont maintenues dans une forme inactive par divers mécanismes pour éviter une induction de l'apoptose dans les cellules normales (Figure 32). BIM et BMF sont retenus au niveau du cytosquelette par interaction avec la dynéine et suite à un signal de mort, ils sont libérés dans le cytoplasme (Puthalakath et al., 1999). La forme inactive de BAD est phosphorylée et va être fixée par la protéine 14-3-3 qui empêche son action. Un autre mécanisme de régulation est l'expression d'un précurseur inactif qui nécessite pour son activation un clivage protéolytique. C'est le cas de BID, décrit ci-dessus, dont le clivage libère sa forme active tBID. Certaines protéines de la famille BCL-2 subissent une régulation au niveau transcriptionnel. L'expression de BAX, NOXA et PUMA peut être induite par p53 (Villunger et al. 2003). De même, HRK/DP5 est contrôlé transcriptionnellement suite à l'absence de facteur de croissance NGF dans les cellules neuronal de rat (nerve growth factor) (Imaizumi et al., 1999).

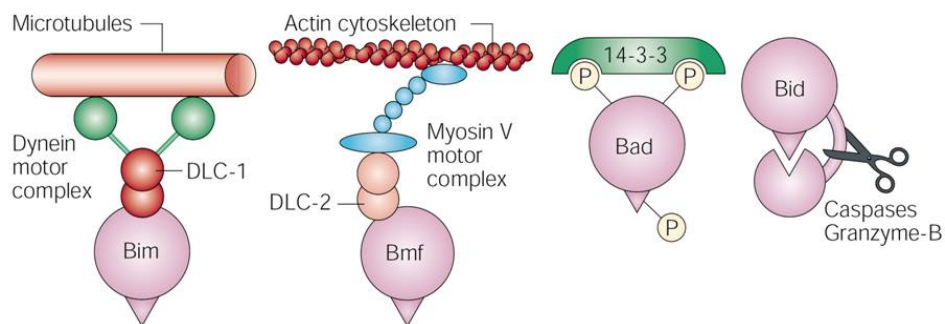


Figure 32. Régulation des protéines BH3. BIM interagit avec la chaîne légère de la dynéine DLC1 et est séquestré au niveau des microtubules tandis que BMF est lié au cytosquelette d'actine par interaction avec DLC2. BAD est séquestré suite à sa phosphorylation, par 14-3-3 et son activation nécessite sa déphosphorylation. BID est inactif jusqu'à son clivage protéolytique par les caspases ou par Granzyme-B. D'après Cory et Adams, 2002

1.5. Voies des signalisations de l'apoptose

On distingue 2 grandes voies de signalisation aboutissant à la mort. La première voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. La deuxième, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose (Figure 33).

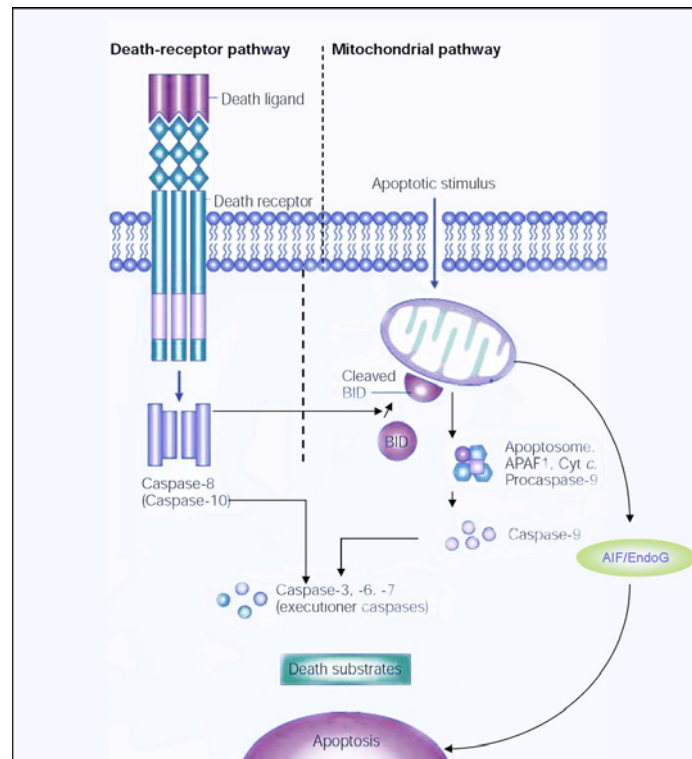


Figure 33. Voies des signalisations de l'apoptose. Adaptée d'Igney et Kramer, 2002).

1.5.1. La voie extrinsèque de l'apoptose (voie des récepteurs de mort)

Les récepteurs de mort (Death receptors) appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Nagata et Golstein, 1995). Six récepteurs de mort ont été identifiés chez l'homme: CD95 (aussi dénommé Fas ou APO-1), TNFR-1 (aussi dénommé p55 ou CD120a), CAR1, DR3 (aussi dénommé Apo3, WSL-1, TRAMP, ou LARD), DR4, DR5 (aussi dénommé Apo2, TRAIL-R2, TRICK-2 ou KILLER) (Ashkenazi et Dixit, 1998). Sur le plan structural, ils sont constitués d'une région extracellulaire riche en cystéine, à laquelle se lie un

ligand, et d'une région intra-cytoplasmique. Les récepteurs de mort possèdent au niveau de cette région une séquence homologue d'environ 70 à 80 acides aminés dénommée domaine de mort (death domain ; DD) dont la présence est nécessaire et suffisante pour initier l'apoptose (Itoh and Nagata, 1993).

Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (ou CD95) activé par son ligand FasL, le récepteur TNFR1 qui lie le TNF et la lymphotoxine α , et DR4 et DR5 qui sont les récepteurs de TRAIL (Figure 34). De plus, il existe un récepteur DR3 dont le ligand est Apo3L.

De façon générale, l'activation des récepteurs de mort induit la formation d'un complexe de protéines sous-membranaires et l'activation des caspases particulières, aboutissant ainsi à l'apoptose. La voie apoptotique Fas/FasL est brièvement discutée. D'une manière générale, la signalisation apoptotique déclenché par TNFR1 et TRAIL est similaire à celle de Fas ne sera pas abordée.

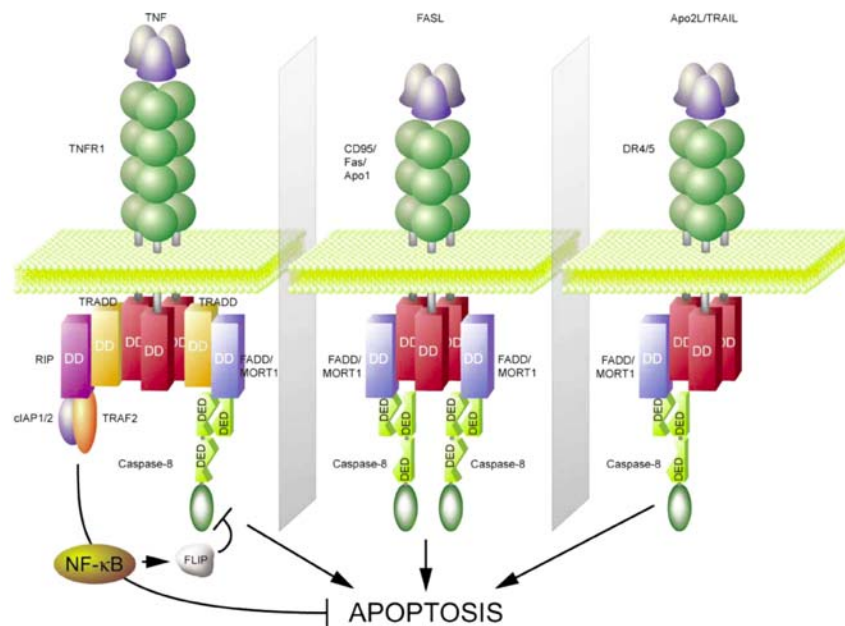


Figure 34. La voie extrinsèque de l'apoptose (voie des récepteurs de mort). D'après Danial et Korsmeyer , 2004

La voie de Fas/FasL

La cascade d'activation de l'apoptose induite par le récepteur Fas est la plus documentée (Peter et Krammer, 1998), d'autant plus qu'elle joue un rôle important dans le système immunitaire (Krammer, 2000). La stimulation de Fas par son ligand, FasL, induit la trimérisation du récepteur CD95 ainsi que l'assemblage des trois domaines de mort. Ensuite la protéine adaptatrice Fadd (Fas-associated death domain) interagit avec les domaines de mort du récepteur par l'intermédiaire de son propre domaine de mort, situé à son extrémité C-terminale. Cette protéine, par un autre domaine, le domaine effecteur de mort (DED) situé dans son extrémité N-terminale, interagit avec les deux domaines DED situés en tandem sur la pro-caspase-8 (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996) pour former un complexe multimoléculaire sous-membranaire, le "death-inducing-signalling-complex" (DISC) (Kischkel et al., 1995). Cette interaction induit l'oligomérisation de la pro-caspase-8 et son activation par un mécanisme d'auto-protéolyse (Muzio et al., 1998). Une fois la caspase-8 activée, le signal transmis en aval du DISC active la caspase-3, laquelle va cliver différents substrats et finalement aboutir à l'apoptose (Enari et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1995; Takahashi et al., 1997).

Scaffidi et al ont montré que, à partir de l'oligomérisation de CD95, l'apoptose peut ensuite suivre deux voies de signalisation (Scaffidi et al., 1998) (Figure 35). Dans les cellules du type I, après fixation de Fadd, une quantité importante de caspase-8 est recrutée au niveau du DISC. Dans ce cas l'activation de cette dernière serait suffisante pour induire la cascade d'activation et ainsi le clivage de la caspase-3 pour aboutir à l'apoptose. Une cinétique d'activation rapide de la caspase-8 en est la caractéristique principale. Cette voie est alors insensible à l'inhibition par Bcl-2. Par contre, si la caspase-8 est recrutée en faible quantité au niveau du DISC, son activation serait insuffisante pour induire la cascade d'activation des caspases. Dans ce cas, la caspase-3 est activée indirectement via le clivage de la protéine Bid (Li et al., 1998; Luo et al., 1998), la libération du cytochrome-c et d'AIF par la mitochondrie et l'activation de la pro-caspase-9 (Srinivasula et al., 1998; Susin et al., 1997). La mitochondrie joue un rôle essentiel en amplifiant le faible signal apoptotique. Les cellules qui empruntent cette voie de signalisation indirecte ont été appelées cellules de type II. La cinétique d'activation de la caspase-8 dans ces cellules est lente. Cette voie serait sensible à l'inhibition par Bcl-2.

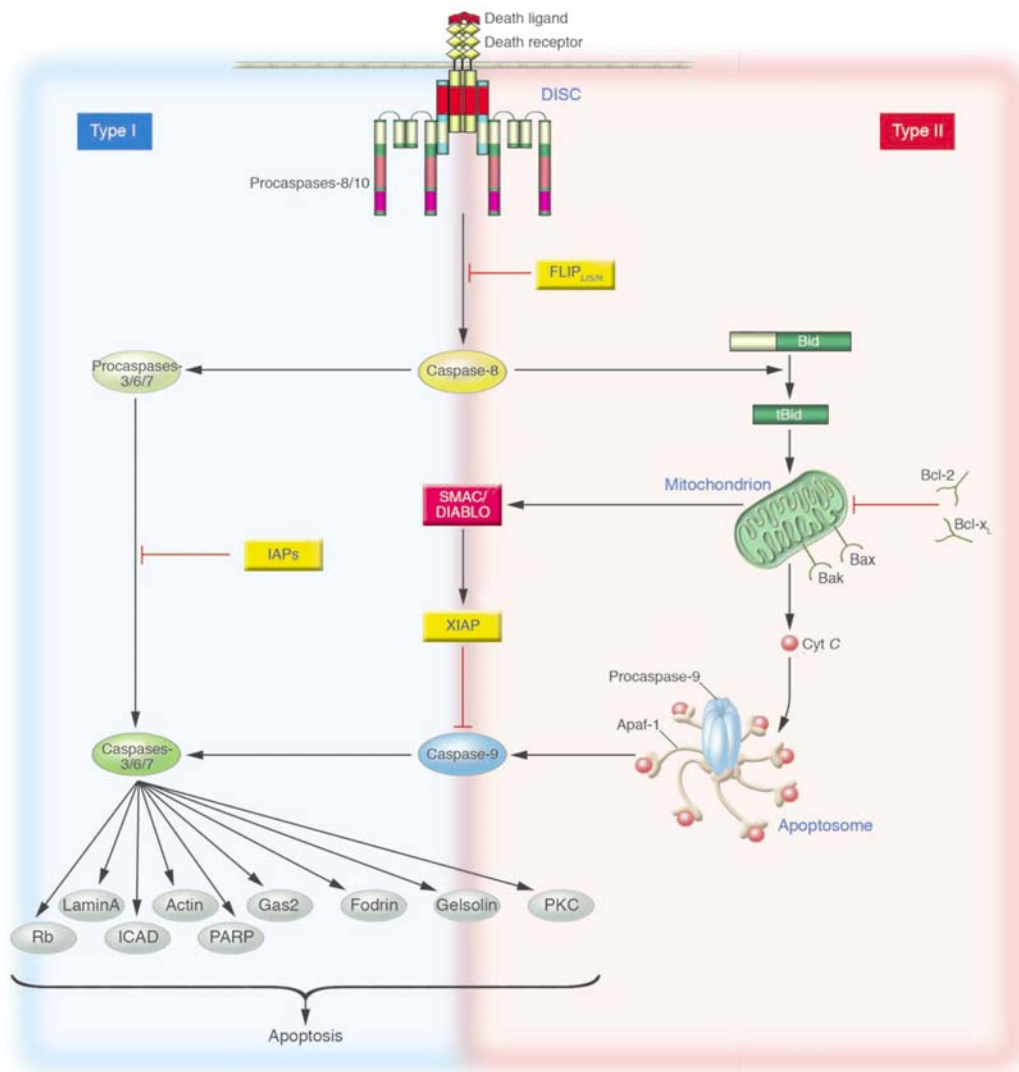


Figure 35. Les deux voies de signalisation CD95 : cellules de type I et type II. Adaptée de Lavrik et al., 2005

1.5.2. La voie intrinsèque de l'apoptose: Voie mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'apoptose (Orrenius, 2004, Green et Kroemer, 2004). Initialement considérée comme la source d'énergie cellulaire, grâce au processus de phosphorylation oxydative, la mitochondrie est considérée aussi aujourd'hui comme un régulateur clé de la décision entre la vie et la mort. De nombreux signaux proapoptotiques activés par divers stimuli comme les drogues chimiothérapeutiques, les récepteurs de mort, les dommages dans l'ADN et dans le cytosquelette, les stress au niveau du réticulum

endoplasmique, la perte d'adhésion, les radiations ionisantes, convergent vers cet organe cellulaire. L'événement majeur de cette voie apoptotique est la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), qui définit le point de non-retour dans la plupart de modèle de mort cellulaire programmée. La perméabilisation de la membrane conduit à la libération dans le cytoplasme des protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire (Figure 36).

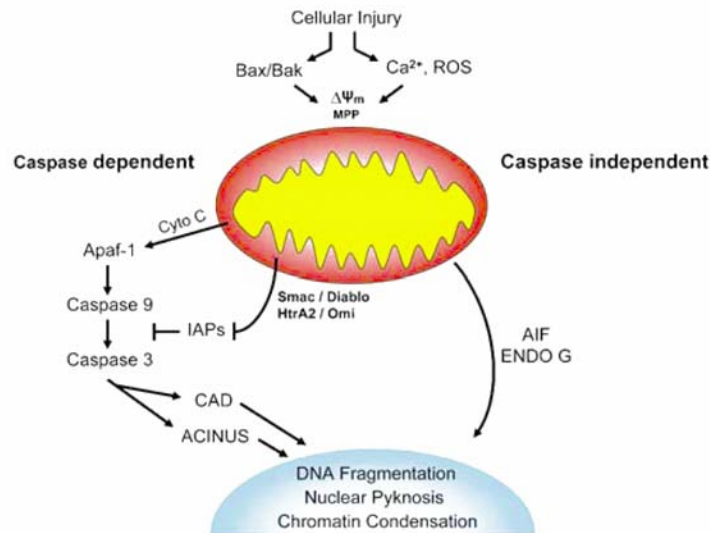


Figure 36. La voie intrinsèque de l'apoptose: Voie mitochondriale. D'après, Cregan et ., 2004.

Perméabilisation membranaire

La perméabilité membranaire mitochondriale est liée à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial interne ($\Delta\Psi_m$) conduisant à la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogènes comme le cytochrome c. L'augmentation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale est contrôlée par des mécanismes encore controversés. Cependant, l'implication des protéines de la famille BCL-2 est reconnue comme essentiel dans ce processus (Green et Kroemer, 2004). Deux modèles ont été proposés selon l'implication des membranes mitochondriales interne et externe (Zamzami et Kroemer, 2001).

Le premier modèle fait intervenir le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mTP). Ce pore, responsable de la libération de facteurs apoptotiques, est un complexe multiprotéique de haute conductivité. La composition exacte du mTP reste encore à déterminer. Toutefois, il serait composé d'un complexe polyprotéique localisé dans les membranes mitochondriales externe

(OM) et interne (IM), dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale. La configuration minimale du mTP regroupe : le canal anionique voltage-dépendant (VDAC, membrane externe), la translocase des nucléotides adényliques (ANT : membrane interne), et la cyclophiline D (Cyp-D, matrice) (Figure 37). Dans une mitochondrie saine, la membrane interne est imperméable et permet à la chaîne de transport des électrons de créer un gradient électrochimique appelé potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Au cours de l'apoptose, l'ouverture du mPT initié par une perméabilisation de la membrane interne permet le passage de molécules de taille inférieure à 1.5 kDa. Ceci résulte en une chute du $\Delta\Psi_m$, à un gonflement de la matrice mitochondriale, dû à une entrée d'eau, et la rupture de la membrane externe, libérant le contenu de l'espace intermembranaire (Ly et al., 2003). Les membres de la famille BCL-2, notamment BID, peuvent interagir avec le mTP et réguler sa perméabilité (Marzo et al. 1998 ; Vander Heiden et al. 2000 ; Rostovtseva et al. 2004). Par ailleurs, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'induction du cytochrome c peuvent se produire indépendamment du mTP. De plus, la libération de cytochrome c peut être observée en absence de chute du potentiel mitochondrial (Kim et al., 2000). Il semblerait que les protéines ANT et Cyp-D ne soient pas indispensables dans ce processus. En effet, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'apoptose se déroulent normalement dans des cellules déficientes en ANT ou en Cyp-D (Lucken-Ardjomande et al., 2004, Nakagawa et al., 2005).

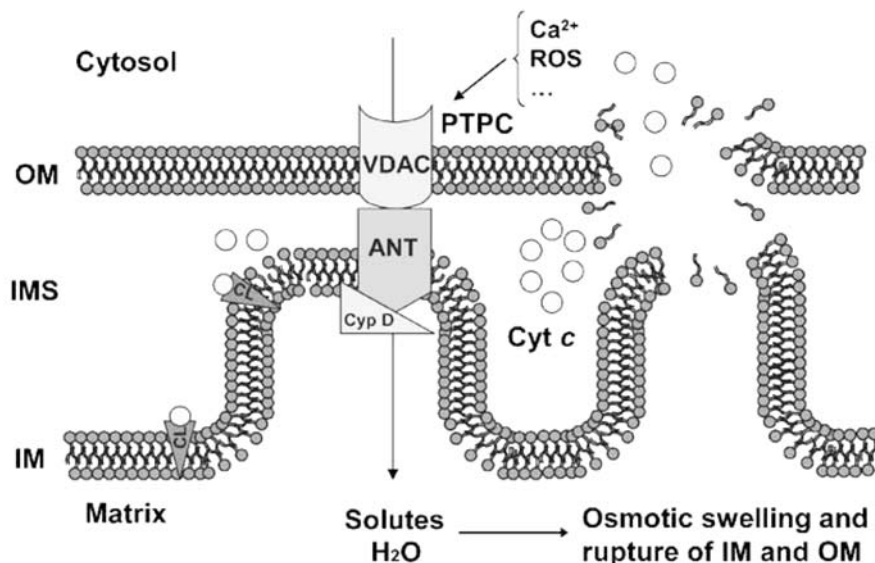


Figure 37. Modèle du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mTP). Adaptée de Garrido et al., 2006

Le deuxième modèle « rheostat model » fait intervenir les protéines de la famille BCL-2 au niveau de la membrane externe et semble être entièrement dépendant de BAX et de BAK (Green, 2005). Ces protéines sont capables de s'insérer dans la membrane externe mitochondriale et de former des pores de façon autonome, une fois oligomérisées. Cette observation est soutenue par le fait que BAX et BAK présentent des similarités de structure avec les domaines d'insertion membranaire de certaines toxines bactériennes capables de former des canaux dans la membrane mitochondriale (Suzuki et al., 2000).

Plusieurs travaux sont en faveur de l'implication de BAX et BAK dans ce modèle. BAX est capable de s'oligomériser avec BID ou BAK et former un pore pour la libération du cytochrome c (Korsmeyer et al., 2000 ; Roucou et al., 2002 ; Mikhailov et al., 2003). Il a également été mis en évidence une coopération entre BAX et le canal VDAC afin de former un pore plus large (Shimizu et al., 2000). La formation par BAX de pores permettant le passage du cytochrome c, dans des liposomes ou des mitochondries isolées a été également décrite (Antonsson et al., 2000 ; Saito et al., 2000). Puisque BAX et BAK peuvent interagir avec les protéines anti-apoptotiques, dans le « rheostat model », la réponse cellulaire à un signal apoptotique dépendrait du ratio entre les membres pro-et anti-apoptotiques de la famille BCL-2.

D'une manière générale, quel que soit le modèle, la perméabilisation des membranes mitochondriales est généralement considérée comme le point de non-retour dans le processus apoptotique avec la libération du cytochrome c, le plus important acteur dans le scénario apoptotique, à côté d'autres facteurs apoptogéniques comme la protéine Smac/DIABLO, AIF, EndoG et Omi/HtrA2 décrites ci-dessous.

Voie mitochondriale caspase-dépendante

Le principal acteur de cette voie est le cytochrome c. Il est synthétisé dans le cytosol sous la forme d'apo-cytochrome c, ensuite est transloqué dans la mitochondrie et s'associe à un noyau hème. C'est une protéine localisée dans la membrane interne de la mitochondrie participant à la chaîne respiratoire (phosphorylation oxydative) comme transporteur d'électrons. Le cytochrome c protège le stress oxydatif cellulaire par l'inhibition de la production d'espèces réactives oxygénées (radicaux libres, ROS) (Garrido et al., 2006). En effet, sa libération peut conduire à une inhibition de la respiration et par conséquent une dépolarisation mitochondriale. Les

dommages au niveau de la chaîne respiratoire peuvent générer des ROS qui sont éliminés de la mitochondrie (Pham et Hedley, 2001). De cette manière, les radicaux libres amplifient le processus apoptotique en provoquant des lésions de la membrane mitochondriale (Fleury et al., 2002).

En plus, lors d'un stimulus apoptotique cette protéine est libérée dans le cytosol et ainsi participe à l'assemblage de l'apoptosome comme décrit ci-dessus. Les travaux de Goldestein et al., montrent que le cytochrome c est libéré dans une seule étape (Goldestein et al., 2005). Cependant d'autres travaux suggèrent que la libération du cytochrome c serait effectuée en deux étapes : la première étape serait responsable de la libération d'une petite quantité de cytochrome c comme résultat d'une partielle perméabilisation de la mitochondrie, suivie d'une deuxième étape où une plus grande quantité de cytochrome c serait libérée suite au remodelage de la crête mitochondriale (pour revue Garrido et al., 2006).

La mitochondrie enferme également dans son espace intramembranaire d'autres protéines capables de déclencher l'activation en cascade des caspases. C'est le cas de la protéine murine Smac et son équivalent humain DIABLO. Ces protéines mitochondriales sont synthétisées sous la forme de précurseurs de 29 kDa et après protéolyse, elles deviennent des protéines matures de 23 kDa, pouvant être libérées en réponse à un stimulus apoptotique (Verhagen et al., 2000). Leur fonction physiologique mitochondriale est inconnue. Cependant sous forme de dimères elles contribuent à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : inhibitors of apoptosis).

Voie mitochondriale caspase-indépendante

L'activation des caspases a été fréquemment considérée comme un synonyme de mort cellulaire par apoptose. Toute fois, l'observation de que l'inhibition de caspases n'était pas suffisante pour empêcher la mort cellulaire dans certains types cellulaires, associée au fait qu'il existe des caspases non apoptotiques (caspases inflammatoires), ont suggéré que la mort cellulaire peut être exécutée en l'absence de caspases. En effet, les protéines mitochondriales apoptotiques comme AIF, EndoG et Omi/HtrA2 ont été décrites dans des voies de mort cellulaires indépendantes de l'activation des caspases.

L'AIF (apoptosis inducing factor) est une flavoprotéine, présentant des homologies avec des enzymes de type oxydoréductases de plantes ou de bactéries identifié par Susin et al (Susin et al., 1999). La protéine présente trois domaines structuraux : un domaine de liaison FAD (FAD-binding domain), un domaine de liaison NADH (NADH-binding domain) et un domaine C-terminal. Ce facteur est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont le prodomaine N-terminale contient deux séquences de localisation mitochondriale (MLS). Une fois introduit dans l'espace intermembranaire (IMS) mitochondrial, il est dans une forme mature de 62 kDa ancré dans la matrice mitochondriale par son domaine N-terminal et exposé vers l'IMS par son domaine C-terminal (Otera et al., 2005). Cette protéine présente une activité oxydoréductase (dû aux domaines de liaison NADH et FAD), qui joue un rôle dans la phosphorylation oxydative, et une fonction apoptotique. Après un stimulus apoptotique, AIF est clivée par les calpaïnes et/ou les cathepsines dans l'IMS. Une protéine de 57kDa est ainsi libérée dans le cytosol et transloquée vers le noyau. Une fois dans le noyau, AIF est capable de s'associer avec l'ADN et d'activer les endonucléases (notamment l'endonucléase G) (Cregan et al., 2004). Cette coopération produit, ainsi de façon indépendante des caspases, la condensation de la chromatine et le clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires de 50kpb (large DNA fragmentation) (Susin et al., 1999 ; Otera et al., 2005). De façon intéressante, les deux activités de la protéine AIF peuvent être dissociées. Il a été démontré que le domaine de liaison FAD n'est pas indispensable pour son activité apoptotique (Loeffler et al., 2001 ; Miramar et al., 2001). L'équipe de Susin a récemment décrit deux nouvelles isoformes d'AIF, AIF short (AIFsh) et AIF short 2 (AIFsh2). AIFsh présente les mêmes effets pro-apoptotiques que la forme longue AIF (Delettre et al., 2006a). L'isoforme AIFsh2 est également libéré dans le cytosol après un stimulus apoptotique, cependant il n'est pas capable d'induire les modifications nucléaires (Delettre et al., 2006)

L'endonucléase G est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire et son rôle principal est d'être impliqué dans la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose des cellules de mammifères, l'endonucléase G est libérée par la mitochondrie, transloquée vers le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (Li et al., 2001; van Loo et al., 2001).

Enfin, nous pouvons citer la protéase Omi, aussi appelée HtrA2. Elle a été identifiée comme une sérine protéase de 49 kDa, homologue à l'endoprotéase bactérienne HtrA2 (Faccio et al., 2000). Omi/HtrA2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 49 kDa portant en position N-terminale un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduite dans l'espace

intermembranaire mitochondrial, elle est clivée et devient une protéine mature de 37 kDa (Savopoulos et al., 2000). Après un stimulus apoptotique, Omi/HtrA2 est libérée dans le cytosol et peut induire une mort soit dépendante soit indépendante des caspases (van Loo et al., 2002 ; Verhagen et al., 2002). En effet, Omi/HtrA2 présente une dualité fonctionnelle. Elle peut soit se lier et inhiber les IAPs déclenchant alors la cascade de caspases, soit elle dégrade, grâce à son activité de sérine protéase, des protéines intracellulaires nécessaires à la vie de la cellule.

Différents modèles cellulaires et de traitement avec certaines drogues anticancéreuses décrivent l'implication de voies apoptotiques en absence de caspases. L'élimination des lymphocytes T activés lors de la réponse AICD (mort cellulaire induite par activation), induite par des récepteurs de mort, est décrite comme un processus dépendant de caspases (Jäättelä et Tschoop, 2003) toutefois l'équipe de Tschoop a montré que le traitement avec un inhibiteur de caspase de large spectre a échoué dans la protection de la mort, résultant par conséquent d'une voie nécrotique indépendante de la caspase8 (Holler et al., 2000).

La mort cellulaire caspase-indépendante peut être induite également par différents récepteurs exprimés dans les cellules T et B, résumés par Nagy et Mooney dans le Tableau 3 (Nagy et Mooney, 2003). Nous pouvons constater que cette voie indépendante de caspase(s) présente les mêmes caractéristiques sans tenir compte du type de récepteur (par exemple, CD2, CD20, MHC-II) à la surface cellulaire.

De plus, il a été décrit que l'élimination de cellules leucémiques par l'agent thérapeutique Imatinib (inhibiteur spécifique de la kinase ABL) peut être effectuée aussi sans l'implication de caspase. Cette mort cellulaire, normalement décrite comme dépendante de caspases, n'a pas pu être bloquée par l'inhibiteur global de caspase (Okada et al., 2004). Récemment, deux équipes ont montré l'implication de voies apoptotiques indépendantes de caspases dans l'utilisation des drogues pour le traitement du myélome multiple ainsi que le cancer du sein (Ishitsuka et al., 2005, Shrivastava et al., 2006).

Enfin, le rôle de la mort cellulaire caspase-indépendante est probablement le même que celui de la mort en présence de caspases, la régulation de l'homéostasie. Cependant il existe encore de lacunes concernant les mécanismes empruntés dans la mort sans caspase.

	CD2 ^c	CD20 ^d	CD45	CD47	CD52 ^d	CD99	MHC-I ^e	MHC-II
Target cell Type	T cells	B cell tumours	CD4+8+ thymocytes	T cells	B cell tumours	Thymocytes T cell tumours	T cell tumours	B cells, T cells, tumours
Activated	Yes	Enhanced	na	Yes	Enhanced	na	na	Yes
Resting	nt	na	na	No	na	na	na	No
Tumour	na	Yes	na	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Kinetics	nt	nt	nt	Fast	nt	Fast	Fast	Fast
PS exposure	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
PARP cleaved	No	No	nt	No	No	nt	No	No
DNA fragmentation^a	Hypodiploidy	nt	TUNEL negative	TUNEL negative	nt	TUNEL negative	No "ladder"	No "ladder" limited fragmentation
Nuclear morphology	Partial chromatin condensation	No chromatin condensation	No chromatin condensation	nt	No chromatin condensation	nt	Peripheral chromatin condensation	Peripheral chromatin condensation
$\Delta\Psi$^b	Reduced	Reduced	Reduced	nt	nt	nt	nt	Reduced
Other	-	-	-	-	-	-	PI-3 induced JNK dependent	PI-3 independent

a Assessed by different methods, e.g. TUNEL, DNA laddering, Hoechst 33342 staining

b Mitochondrial membrane potential

c Both caspase-independent and caspase-dependent pathways are induced sequentially; only caspase-independent events are shown

d Induced only after cross-linking of the relevant mab on the cell surface with a second (anti-igG) antibody

e Induced only after cross-linking of biotinylated anti-MHC-I mab with avidine

[PS phosphatidylserine, PARP poly(ADP-ribose) polymerase, nt not tested, na not applicable, TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, PI-3 phosphatidylinositol 3-kinase, JNK Jun N-terminal kinase]

Tableau 3. Caractéristiques de la voie apoptotique caspase indépendante. D'après Nagy et Mooney, 2003.

2. Protéines de stress et apoptose

2.1. Généralité sur les protéines de stress

Les protéines de stress, ou Hsp (heat shock protein), forment une famille de protéines hautement conservée au cours de l'évolution. Elles exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress d'origine chimique, physique ou métabolique. Ces protéines ont été classifiées en cinq familles en fonction de leur poids moléculaire : Hsp110, Hsp 90, Hsp70, et les petites Hsps, comme Hsp27 (Tableau 4).

Main Hsps involved in apoptosis			
HSP	Location	Apoptotic function	Main apoptotic targets ^a
HSP27	Cytosol/nucleus	Anti-apoptotic	-: ROS, Q/tochome c +: NF-κB, AKT
HSP60	Mitochondria	Pro-apoptotic	+: Caspase 3
HSP70	Cytosol/nucleus	Anti-apoptotic	-: AIF, Apaf1, CAD, DR4, DR5, cathepsins, JNK +:AKT
HSP90	Cytosol/nucleus	Anti-apoptotic	-: Apaf1, calpains + AKT, RIP1
HSP110	Cytosol/nucleus	Anti-apoptotic	?

^a A minus sign denotes negative regulation, a plus sign indicates positive regulation

Tableau 4. Les principaux Hsps impliquées dans l'apoptose. D'après Didelot et al., 2006

Chaque famille de Hsps est composée de membres exprimés de façon constitutive, mais également de membres dont leur expression est régulée par induction, et topographiquement attribués à différents compartiments subcellulaires. (Tableau 4). Les Hsp60, HSC70, et Hsp90 sont constitutivement exprimées dans les cellules, alors que Hsp27 et Hsp70 sont induits par différents types de stress comme le choc thermique, le stress oxydatif ou également par des drogues anticancéreuses.

Certaines Hsps, comme Hsp90, 70, 60 et 27 agissent comme des protéines chaperones. Elles vont lier les peptides, les protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation et vont

ainsi permettre leur repliement correct et leur translocation dans les compartiments subcellulaires appropriés (Gething et Sambrook, 1992). Elles sont aussi capables de lier des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions (Parsell et Lindquist, 1993).

Il est maintenant accepté que les Hsps jouent un rôle important dans différentes étapes de l'apoptose. De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre les effets protecteurs des protéines du stress, Hsp27, Hsp70 et Hsp90 dans la suppression de l'apoptose.

2.2. Principales Hsps impliquées dans l'apoptose

Didelot et al ont fait une revue de la littérature sur les rôles de protéines Hsps comme modulateurs de la mort cellulaire par apoptose (Didelot et al. ; 2006). Ci-dessous un bref exposé décrira les principaux rôles des Hsp27, 70 et 90 comme tels modulateurs.

2.2.1. Hsp27

Hsp27 appartient à la famille des petites protéines du stress, dont la taille varie de 15 à 30kDa. Elles sont exprimées dans un grand nombre de types cellulaires et dans les tissus à différentes étapes de leur différenciation et maturation (Garrido et al., 1998). Son expression dans les cellules malignes contribue à la tumorigenèse.

Les protéines Hsp27 ont la capacité de former des structures oligomériques (Mehlen et Arrigo, 1994). La protéine Hsp27 possède 205 acides aminés et son oligomérisation dépend de la phosphorylation au niveau de ses trois résidus serines. La formation de ces structures oligomériques (jusqu'à 50 homo ou hétérodimères d'Hsp27) est très dynamique et permet de disposer en permanence de la protéine de façon à exercer rapidement ses fonctions cellulaires (Ehrnsperger et al., 1999; MacRae, 2000).

Hsp27 est phosphorylée, de manière réversible par la MK2 (pour MAPKAP2) elle-même activée par la principale kinase du stress : la MAP kinase P38 (Freshney et al., 1994). Hsp27 adopte une forme non phosphorylée dans les oligomères de haut poids moléculaire alors que sa forme

phosphorylée se dissocie des agrégats cytoplasmiques et peut permettre sa translocation nucléaire (Kato et al., 1994).

Une des principales fonctions d'Hsp27 est sa capacité à inhiber l'apoptose en se fixant et inhibant des protéines pro-apoptotiques souvent activées sous les conditions de stress (Beere, 2004; Garrido et al., 2001).

Garrido et al ont été les premiers à décrire la capacité de Hsp27 à inhiber l'activation de la procaspase 9 par le cytochrome c (Garrido et al., 1999). Une autre étude a montré la capacité de Hsp27 à s'associer et à réguler négativement l'activation de la caspase 3 (Pandey et al., 2000). Les deux articles s'accordent sur le fait que la libération du cytochrome c par la mitochondrie n'est pas modulée par cette chaperone. Les auteurs montrent que Hsp27 peut inhiber l'activation des caspases après libération du cytochrome c probablement au niveau de l'apoptosome. Cependant la cible de Hsp27 diverge selon les auteurs. L'étude de Bruey et al montre que Hsp27 peut empêcher l'activation de la caspase 9 par le cytochrome c et le dATP et que cette inhibition est postérieure à la libération du cytochrome c mais antérieure à l'activation de la procaspase 9 (Bruey et al., 2000a). Les auteurs en déduisent que Hsp27 doit interagir avec une des molécules formant l'apoptosome telle que le cytochrome c lui-même, la caspase 9 ou encore Apaf-1. En revanche l'étude de Pandey et al montre que Hsp27 ne peut empêcher la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 mais qu'elle est capable d'inhiber l'activation de la caspase 3 en s'associant directement avec elle.

Quelle que soit la cible de Hsp27, il semble bien établi que cette chaperone puisse intervenir dans la cascade apoptotique post mitochondriale, soit en aval soit directement au niveau de l'apoptosome. Cet effet anti-apoptotique nécessite sa forme non phosphorylée structurée en oligomères (Bruey et al., 2000b). Ceci permet d'expliquer le rôle protecteur de Hsp27 sur l'apoptose induite par différents agents pro-apoptotiques (Huot et al., 1991; Oesterreich et al., 1993; Garrido et al., 1997).

De plus, il a été décrit que Hsp27 peut augmenter la défense anti-oxydante cellulaire par la diminution du niveau cellulaire de ROS (Mehlen et al. 1996a) ainsi que par la neutralisation des effets toxiques générés par les protéines oxydées (Rogalla et al. 1999). L'effet protecteur ne dépend pas de son interaction avec cytochrome c mais de sa phosphorylation (Wytenbach et al. 2002).

Les études plus récentes ont montré que Hsp27 est capable d'associer avec la protéine AKT induisant son activation dans des conditions de stress (Rane et al., 2003) qui a son tour est capable de phosphoryler Hsp27. Hsp27 dans sa forme phosphorylé interagi avec DAXX et empêche l'apoptose induite par cette dernière. DAXX étant une protéine impliquée dans l'apoptose induite par Fas (Charrete et al., 2000).

Une autre activité anti-apoptotique de Hsp27 a été décrite par l'équipe de Garrido. Hsp27 augmente la dégradation par le proteasome d'I κ B polyubiquitiné (inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B) et contribue, ainsi à l'activation de la voie NF- κ B et à la survie cellulaire (Parcellier et al., 2003).

Ainsi, Hsp27 est capable d'interagir avec différents partenaires impliqués dans le processus d'apoptose. Les études suggèrent que le statut de phosphorylation de Hsp27, capable de moduler son niveau d'oligomérisation « in vitro », pourra lui permettre l'inhibition de l'apoptose, soit au niveau mitochondrial (état non phosphorylé), soit au niveau de la voie des récepteurs des morts (état phosphorylé).

2.2.2. Hsp70

Parmi toutes les protéines de stress décrites, la famille Hsp70 est la plus conservée. Il existe des analogues de Hsp70 des bactéries les plus primitives aux mammifères et à l'homme. Certains membres sont spécifiquement associés à des compartiments intracellulaires comme le cytosol (Hsp70/HSC70), ou à des organelles telles que la mitochondrie (Hsp75) ou le réticulum endoplasmique (GRP78). Ces protéines participent à la bonne conformation des protéines (Martin et Hartl, 1994; Hartl et Martin, 1995), la suppression de l'agrégation des protéines, la réactivation des protéines dénaturées (Gething et Sambrook, 1992), la translocation nucléaire (Shi et Thomas, 1992), l'élimination des manteaux de clathrine des vésicules (Ungewickell, 1985), l'import mitochondrial (Terada et al., 1995), le ciblage de polypeptides vers les lysosomes pour la dégradation (Chiang et al., 1989; Terlecky et al., 1992), la dégradation d'ARNm (Laroia et al., 1999), et enfin, la régulation de la réponse suite à un choc thermique (Lindquist, 1986).

A l'instar de Hsp27, Hsp70 joue un rôle dans la tumorigenèse comme décrit par Jaatela dans un modèle de souris (Jaatela, 1995). Par ailleurs, la diminution de Hsp70 est capable d'induire la mort cellulaire. En effet, les cellules d'une lignée de souris établie knock-out pour *Hsp70.1* et *Hsp70.3* sont sensibles à l'apoptose (Schmitt et al., 2003).

L'effet anti-apoptotique des Hsp70 a été attribué à de nombreux mécanismes et à différents partenaires comme : Apaf-1 ; la forme longue d'AIF; CAD ; ainsi que les molécules de signalisation : JNK-1, p53 et c-myc.

La surexpression de la protéine Hsp70 protège les cellules de l'apoptose induit par stress, aussi bien en amont qu'en aval de l'activation de la cascade de caspases. Li et al ont montré que la protéine Hsp70 est capable d'inhiber l'apoptose après la libération du cytochrome c et avant l'activation de la caspase-3 (Li et al., 2000). Cet effet anti-apoptotique peut être expliqué par la modulation de l'apoptosome. En effet, la Hsp70 est capable de se lier à la protéine Apaf-1 et ainsi empêcher le recrutement de la procaspase-9 au niveau de l'apoptosome. (Beere et al. 2000; Saleh et al. 2000)

De plus, Hsp70 peut empêcher la voie apoptotique caspase indépendante, par son association directe avec AIF. Hsp70 est capable de neutraliser les effets apoptogéniques de la protéine AIF comme la condensation de la chromatine. (Susin et al.; 1999 et Loeffler et al.; 2001). Il a été également décrit que l'activité enzymatique de la Dnase CAD est régulée par la protéine Hsp70. (Sakahira et Nagata 2002), ainsi que le blocage du signal conduisant à l'activation des JNK (Meriin et al., 1999; Park et al., 2001). Ce mécanisme semble être dépendant de Bid puisque cet effet protecteur de Hsp70 a été supprimé dans les cellules MEF déficiente en Bid (Mosser et al., 2000).

Les études de Jolly et Morimoto ont montré que Hsp70 peut être associée aux protéines pro-apoptotique p53 et c-myc, cependant l'impact fonctionnel de ces interactions reste à élucider. (Jolly et Morimoto 2000).

2.2.3. Hsp90

Hsp90 α , Hsp90 β et Grp94 sont les membres les plus importants de la famille de protéines Hsp90 (Sreedhar et al.; 2004). Les deux isoformes de Hsp90 sont essentiels pour la viabilité des cellules eucaryotes. Leur expression est constitutive totalisant 1 à 2% des protéines cytosoliques et peut être également augmentée par le stress.

L'effet anti-apoptotique des Hsp90 a été attribué à de nombreux mécanismes et différents partenaires. De la même manière que Hsp70, Hsp90 est capable de s'associer directement à Apaf-1 et d'inhiber son oligomérisation et le recrutement de la procaspase-9 (Pandey et al., 2000). Des études récentes ont montré l'association directe de Hsp90 avec la protéine AKT phosphorylée, la protéine RIP (Receptor-Interacting Protein) et la protéine p53 (Sato et al. ; 2000, Lewis et al. ;2000, Zhang et al. ; 2004).

3. Conclusions

La mort cellulaire programmée ou apoptose est essentielle pour le développement et le contrôle de l'homéostasie dans tous les organismes multicellulaires. Ce processus est effectué à travers deux voies alternatives : la voie des récepteurs de mort, localisés à la surface cellulaire, appelée voie extrinsèque, et la voie intrinsèque ou mitochondriale induite par une grande diversité de stimuli. Au cours de l'apoptose les modifications cellulaires telles que la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, la perte d'asymétrie membranaire et le rétrécissement cellulaire sont dépendants de l'activation de caspases qui à leur tour, sont capables de cliver certains substrats cellulaires. La caspase-9 est capable de s'associer à un complexe multiprotéique, appelé apoptosome composé du cofacteur Apaf-1, ATP et de la protéine apoptogénique cytochrome c, libérée par la mitochondrie. Ce complexe permet l'activation de cette caspase et ainsi l'activation subséquente de caspases effectrices. Cependant, la mort cellulaire par apoptose peut se produire en absence de caspases suite à la libération de protéines pro-apoptotiques dans le cytosol par la mitochondrie, comme la protéine AIF. La libération de protéines pro-apoptotiques par la mitochondrie est possible grâce à une augmentation de la perméabilité membranaire en raison de la formation de pores contrôlée par l'interaction entre les membres de la famille BCL-2, ceci conduisant à la dissipation du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$). La mitochondrie joue un rôle important lors de l'apoptose puisque la perméabilisation membranaire est considérée le point de non-retour du processus apoptotique.

Enfin, il est maintenant accepté que les Hsps jouent un rôle important dans différentes étapes de l'apoptose comme modulateurs de ce processus, notamment les protéines Hsp27, 70 et 90.

La mort cellulaire est un phénomène physiologique hautement régulée qui joue un rôle essentiel au cours du développement, dans le renouvellement cellulaire, l'homéostasie du système immunitaire et du système hématopoïétique, le contrôle des tissus hormono-dépendants. Ainsi des anomalies dans ce processus apoptotique sont à l'origine de nombreuses pathologies, comme, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, et le cancer.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le récepteur Fc γ RIIB, joue un rôle clé dans la régulation négative des réponses immunes. Il est capable d'inhiber la signalisation cellulaire via le récepteur du lymphocyte B, le BCR. Cette signalisation est dépendante de la phosphorylation du résidu tyrosine du motif ITIM (Immune-receptor Tyrosine-based Inhibition Motif) intracellulaire qui conduit à l'arrêt de la prolifération et dans certains cas à l'apoptose du lymphocyte B. La co-ligation de récepteur Fc γ RIIB seul induit un processus de mort cellulaire indépendant du motif ITIM du récepteur Fc γ RIIB, encore très peu caractérisée, et qui participerait à la sélection négative de lymphocytes B peu spécifiques de l'antigène.

Récemment, un rôle potentiel de Fc γ RIIB dans la tumorigénèse a été identifié. En particulier, la dérégulation de l'expression de Fc γ RIIB suite à des translocations chromosomiques a été rapportée dans des cas de lymphomes folliculaires. L'identification du gène *FCGR2B* comme étant le gène cible d'une translocation t(1;22)(q22;q11) dans une lignée de lymphome folliculaire B (B593) nous a amené à étudier les conséquences de la surexpression de Fc γ RIIB sur ses fonctions régulatrices dans la lignée B593.

L'objectif de ce travail a été de déterminer, dans un premier temps, les conséquences du recrutement des récepteurs Fc γ RIIB, et dans un deuxième temps, les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante.

Nous avons tout d'abord étudié les conséquences du recrutement des récepteurs Fc γ RIIB seuls dans la lignée B593, comparée à d'autres lignées tumorales B, exprimant des niveaux différents de Fc γ RIIB.

Nous avons ensuite entrepris la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante dans la lignée B593.

Par ailleurs, nous avons évalué la signalisation du récepteur Fc γ RIIB lors du co-recrutement avec le récepteur à l'antigène du lymphocyte B, le BCR.

Enfin, nous avons développé un modèle cellulaire pour approfondir l'étude de l'implication de la dérégulation de Fc γ RIIB dans la lymphomagenèse.

MATERIEL ET METHODES

I. CELLULES

1. Lignées Cellulaires

La lignée B593 a été établie au laboratoire par greffe hétérologue sur souris immunodéficente (souris NUDE) de cellules lymphomateuses d'un patient présentant un lymphome malin de type centrofolliculaire (grade III). La lignée a été ensuite établie in vitro (T. Bonnefoix). Elle se caractérise par une translocation équilibrée t(1;22)(q22;q11) associée à une translocation t(14;18) avec dérégulation de BCL2. Parallèlement, une lignée a été établie à partir des lymphocytes B normaux du patient par immortalisation par le virus EBV (lignée B-EBV). La lignée Daudi (ATCC), la lignée BL41 (fournie par Dr. Gabriella Sarmay), la lignée BL136 et la lignée Raji (fournies par le CIRC-Lyon (centre international de recherche sur le cancer)) sont dérivées de lymphomes de Burkitt. La lignée RL (ATCC) est dérivée d'un lymphome B centrofolliculaire, la lignée Jurkat (DSMZ) est dérivée d'une leucémie lymphoblastique T. La lignée U937 (ATCC) a été établie à partir d'une leucémie aiguë de type monocytaire. La lignée HL60 (ATCC) a été établie à partir d'une leucémie aiguë de type promyélocytaire, la lignée BA/F3 (DSMZ) est une lignée prolymphocytaire.

2. Cultures

Les cellules sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 Medium contenant des antibiotiques (100 µg/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine), des acides aminés non essentiels (1,4 mM) et du pyruvate de sodium (1,4 mM). Ce milieu est complété avec du Sérum de Veau Fœtal (SVF 10%). L'ensemble des produits cités proviennent de Invitrogen, Rockville, MD, USA. Les cultures sont réalisées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules sont numérées en cellule de Malassez dans une solution d'Acridine orange /Bromure d'Ethidium (AO/BET). Selon le profil de prolifération de chaque lignée, une dilution en milieu frais est réalisée 2 à 3 fois par semaine.

3. Congélation

Les cellules sont resuspendues dans 1 volume de RPMI 50% SVF pré-refroidi puis diluées avec 1 volume d'une solution de DMSO (diméthyl sulfoxyde ; Sigma Aldrich France) 20%, RPMI 25%, SVF 25%. La concentration finale de DMSO est de 10%. Les cellules sont ensuite réparties dans des cryotubes (Nunc) et placées à -80°C (pour une descente lente en température) une nuit, puis transférées en azote liquide.

4. Décongélation

Les cryotubes sont décongelés au bain marie à 37°C, pour une remontée rapide en température, puis leur contenu est dilué, goutte à goutte, avec une solution de RPMI 10% SVF préchauffée à 37°C. Après une incubation de 10 minutes, les cellules sont lavées en milieu complet (1400 rpm, 5 minutes à 20°C), puis laissées au repos 1 heure à température ambiante dans le milieu de culture pour éliminer toute trace de DMSO. Après lavage, les cellules sont numérotées avec évaluation de la viabilité puis mises en culture.

II. CYTOMETRIE EN FLUX

Plusieurs de nos expériences ont été réalisées par des techniques de cytométrie en flux (CMF). Nous avons utilisé le cytomètre FACScan, dont le laser a une longueur d'onde de 488 nm (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La cytométrie en flux permet l'analyse individuelle et multiparamétrée de cellules ou d'éléments subcellulaires. Les cellules défilent devant un rayon laser et le cytomètre en flux enregistre la façon dont chaque cellule interagit avec le laser. L'analyse des faisceaux diffractés et reflétés donne des informations sur la taille de la cellule (FSC-forward scatter) et sa granularité (SSC-side scatter), respectivement. Lorsque les cellules sont préalablement marquées par un colorant fluorescent, celui-ci est excité par le laser et l'analyse de la fluorescence émise apporte des informations supplémentaires. Les données obtenues sont traitées par ordinateur et analysées à l'aide du logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

1. Analyses des cellules

1.1. Marquage direct

Une suspension cellulaire de 500 000 cellules est lavée (400G/10') en PBS à 4°C, remise en suspension dans 250 µl de PBS contenant 1% de BSA (sérum albumine bovine) en présence soit de l'anticorps IgG1 de souris anti-CD32 humain marqué à la FITC (isocyanate de fluoresceine, DakoCytomation) ou l'anticorps IgG2a de souris anti-CD32 humain marqué à la PE (phycoérythrine, Immunotech) ou de l'anticorps IgG1 de souris anti-CD79b humain marqué à la PE (phycoérythrine, Immunotech) pendant 30 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois puis resuspendues dans 500µl de PBS pour être analysées en CMF. La fixation non spécifique est évaluée par un anticorps irrelevant (contrôle isotypique) incubé dans les mêmes conditions. L'acquisition est faite sur 10 000 évènements pour chaque point.

1.2. Marquage indirect

Un prélèvement de 500 000 cellules est lavé (400G/10') en PBS à 4°C, remis en suspension dans 250 µl de PBS contenant 1% de BSA en présence de l'anticorps primaire de souris anti-Fc γ RII, clone FLI 8.26 (BD Pharmingen), pendant 30 minutes à 4°C. Après lavage, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine (FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat anti-mouse IgG (H+L)-Immunotech Coulter Marseille France), pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont lavées par centrifugation puis analysées en CMF. Deux contrôles sont inclus systématiquement : une IgG de souris du même isotype que l'anticorps primaire (IgG2b, RD&Systems), incubée dans les mêmes conditions (contrôle isotypique) et l'anticorps secondaire seul. L'acquisition est faite sur 10 000 évènements.

Pour les 2 méthodes de marquage, le pourcentage de cellules marquées est calculé sur une fenêtre d'acquisition correspondant aux cellules vivantes. Le seuil de détection est déterminé par rapport au témoin négatif (cellules seules et contrôle isotypique). L'intensité de marquage est évaluée par l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) obtenue par analyse statistique des histogrammes de fluorescence (logiciel Cell Quest-BD).

2. Etude de la mort cellulaire Fc γ RIIB-dépendante

La capacité d'analyse individuelle et multiparamétrée d'un grand nombre de cellules ou d'éléments subcellulaires de manière semi quantitative à une très haute vitesse fait de la CMF un outil bien adapté à l'étude de la mort cellulaire.

2.1. Homoagrégation des récepteurs Fc γ RIIB

L'étude des réponses cellulaires au recrutement des récepteurs Fc γ RIIB seuls a été réalisée à l'aide de l'anticorps anti-Fc γ RII, FLI 8.26. Les doses de FLI 8.26 ont été établies de la manière suivante : les cellules (2 ml à 5×10^7 /ml) sont mises en culture en plaque 12 puits en présence de FLI 8.26 pendant différents temps (0h, 1/2h, 2h, 4h, 16h, 24h, 48h) à différentes concentrations finales (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 et 10.0 μ g/ml), en dupliquat. Les doses de 1.0 et 10.0 μ g/ml ont été retenues et utilisées pour le recrutement des récepteurs Fc γ RIIB dans les conditions suivantes:

1. Cellules sans anticorps
2. Cellules + anticorps FLI 8.26 (1.0 et 10 μ g/ml)
3. Cellules + contrôle isotypique (1.0 et 10 μ g/ml)
4. Cellules + anticorps anti-Fas (7C11) (témoin positive de l'apoptose).

Les cellules sont incubées à 37°C pendant 4, 24 et 48 heures.

Les anticorps suivant ont été utilisés : FLI 8.26 (IgG2b κ) monoclonal de souris anti-Fc γ RII (BD-Pharmingen-France), IgG2b monoclonale de souris (R&D System, UK Europe) et clone 7C11 monoclonal de souris anti-CD95 (Immunotech, Marseille, France).

2.2.1. Régulation par un inhibiteur global des caspases

L'apoptose induite par le recrutement de Fc γ RIIB a été étudiée en présence d'un inhibiteur global des caspases, le Z-VAD(OMe)-FMK ou d'inhibiteurs spécifiques des caspases-8 et -9, respectivement le Z-IE(OMe)TD(OMe)-FMK et le Z-LE(OMe)HD(OMe)-FMK. Ces réactifs

proviennent de Calbiochem, UK Europe. Les cellules sont pré-incubées 3h à 37°C en présence de l'inhibiteur à la concentration de 100 µM, puis cultivées dans les conditions de recrutement de FcγRII décrites ci-dessus. Une culture réalisée en présence d'un anticorps anti-Fas a été utilisée comme témoin d'apoptose sensible au Z-VAD(OMe)-FMK. L'apoptose est évaluée par incorporation de l'annexine V à 4, 24 et 48 heures.

2.2. Externalisation des phosphatidylsérines

Un des critères les plus étudiés lors des phases précoces de l'apoptose est la translocation de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. Il est possible de détecter l'externalisation de ces phospholipides anioniques par un marquage à l'annexine V-FITC, l'annexine V se fixant spécifiquement sur les phosphatidylsérines. L'externalisation des phosphatidylsérines a été mesurée à l'aide du kit Annexin V-FITC (Immunotech-Coulter, France). Après recrutement des récepteurs FcγRIIB dans les différentes conditions, les cellules sont lavées dans du PBS 1x et pour chaque condition 250.000 cellules sont reprises dans 100 µl de tampon de réaction (100 µl de tampon de marquage 10X, 1 µl d'annexine V-FITC et 5 µl d'iodure de propidium). Après 10 min d'incubation dans l'obscurité à 4°C, chaque réaction est diluée dans 400 µl de tampon de marquage 1X pour obtenir un volume final approprié pour l'analyse. Celle-ci est effectuée immédiatement en CMF.

2.3. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$

Le potentiel transmembranaire mitochondrial est le résultat d'une distribution asymétrique de protons et d'autres ions des deux cotés de la membrane interne de la mitochondrie. La face interne de la membrane interne de la mitochondrie est chargée négativement, par conséquent une sonde fluorescente cationique lipophile va avoir une affinité pour la matrice mitochondriale et va s'accumuler dans la mitochondrie. La dépolarisation mitochondriale peut être mise en évidence grâce à la perte de la capacité des cellules apoptotiques d'accumuler ce type de sonde fluorescente.

2.3.1. Utilisation du DiOC6(3)

La mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$ a été réalisée avec le marqueur DiOC6(3). Le DiOC6(3) (3,3'-dihexyloxocarbocyanine iodide) est une molécule lipophile qui fluoresce en vert. Lorsque la cellule est viable, la charge négative établie par le potentiel membranaire mitochondrial permet à ce fluorochrome chargé positivement de s'accumuler dans la membrane lipidique, fluorescent en vert. Dans les cellules apoptotiques, le potentiel mitochondrial diminue et le DiOC6(3) ne peut plus s'accumuler dans la membrane à une concentration suffisante. En cytométrie en flux, la chute du potentiel mitochondrial dans les cellules en apoptose est donc mise en évidence, après marquage au DiOC6(3), par une diminution de la fluorescence verte.

Pour cette expérience, après le recrutement des récepteurs $Fc\gamma RIIb$, 500 000 cellules sont prélevées, lavées au PBS1X et incubées pendant 15 min à 37°C en présence de DiOC6(3) à 400nM dans du RPMI 2%SVF (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Les cellules sont analysées par cytométrie en flux. L'iodure de propidium (IP) est utilisé en combinaison avec le DiOC6(3) pour faire la distinction entre les cellules viables qui sont uniquement marquées en vert, les cellules apoptotiques précoces dont la fluorescence verte est diminuée et les cellules apoptotiques tardives qui sont marquées simultanément par le DiOC6(3) et par l'iodure de propidium.

2.4. Détection de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN oligonucleosomal (fragmentation à petite échelle) est une des marques caractéristiques de l'apoptose. L'ADN peut être marqué et la fragmentation peut être facilement visualisée sur gel d'agarose. Nous avons utilisé le kit Enhanced Apoptotic DNA Ladder Detection (MBL) pour cette étude.

Les cellules de la lignée B593 ont été incubées comme décrit ci-dessus. Les cellules incubées avec l'anticorps anti-Fas sont utilisées comme contrôle positif de la fragmentation. Après l'induction les cellules sont centrifugées à 400g pendant 6 minutes à température ambiante et transférées dans un tube de micro-centrifugation de 1,5 ml. Ensuite les cellules sont lavées en

PBS par centrifugation 400g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été enlevé délicatement. Les cellules sont lysées pendant 5 minutes dans la glace dans 40 µl de Tampon de lyse TE, et sont ensuite mélangées vigoureusement pendant 5 secondes, puis centrifugées pendant 5 minutes à 400g à température ambiante. Le surnageant a été soigneusement transféré dans un nouveau tube de micro-centrifugation et incubé pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite 5 µl de la solution « enzyme B » sont ajoutés. Après une période d'incubation de 18h à 50°C, 5 µl de la solution d'acétate d'ammonium sont ajoutés. Ensuite le tube est agité vigoureusement et 50 µl d'isopropanol sont ajoutés. Le tube est de nouveau agité et maintenu à -20°C pendant 10 minutes pour permettre la précipitation de l'ADN. Le culot d'ADN est lavé avec 0,5 ml d'éthanol à 70%. Les traces d'éthanol sont éliminées par évaporation à température ambiante. Ensuite l'ADN est solubilisé dans 20 µl de Tampon de solubilisation de l'ADN. La séparation des fragments d'ADN est effectuée par électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose à 1.8% dans le tampon TAE pH 7.8 (Tris-acétate 40mM / EDTA 2mM), à 45 volts pendant 1 à 2 heures. Le gel est coloré au bromure d'éthidium (BET, 0.5µg/ml) et photographié sous illumination UV.

III. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

1. Etude de la mort cellulaire FcγRIIB-dépendante

1.1. Etude de la morphologie cellulaire

Les modifications morphologiques nucléaires observées au cours de l'apoptose peuvent être visualisées en microscopie de fluorescence. Le DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) est un colorant fluorescent bleu capable de se fixer aux molécules d'ADN, permettant ainsi de distinguer une cellule viable d'une cellule apoptotique. Le noyau d'une cellule viable - ayant un contenu nucléaire normal - est marqué de façon diffuse par le DAPI alors que le noyau d'une cellule apoptotique apparaît sous forme de petites sphères bleues qui reflètent la condensation de la chromatine.

Pour l'analyse morphologique suite au recrutement des récepteurs FcγRIIB, 500 000 cellules sont prélevées, lavées au PBS1X, centrifugées à 400g pendant 5 minutes à température ambiante, et reprises dans 250 µl d'une solution de DAPI à 2µg/ml. Un aliquot de 100 µl est prélevé et mis entre lame et lamelle. L'analyse de 100 cellules par lame est faite à l'aide d'un

microscope à fluorescence (ZEISS Axioscop) (lampe HB 100W) avec objectif à immersion 100x. Le microscope est équipé d'une caméra CCD (Couple Charge Device) (Photometrics, Tucson, AZ) utilisant le logiciel SmartCapture (Vysis, Voisin le Bretonneux, France). La caméra étant en noir et blanc, la couleur bleue a été attribuée artificiellement.

IV. WESTERN BLOT

1. Etude de la mort cellulaire Fc γ RIIB-dépendante

1.1. Extraction protéique et Western Blot

Les cellules sont lavées dans du PBS, puis reprises dans un tampon de lyse (Triton 1%, Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, EDTA 5mM pH 8, EGTA 0,5mM, AEBSF 1mM, Iodoacetamide 100 μ M, Leupeptine 10 μ M, NaF 50mM, Na₃VO₄ 500mM) pendant au moins 20 min à 4°C et centrifugées à froid à 10 000 g pendant 20 min. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et un petit volume est prélevé pour le dosage protéique (méthode BCA, Pierce, Rockford, IL, USA). Un contenu en protéines de 10-30 μ g est déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant de 10 ou 15% puis transféré sur une membrane de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA), après électrophorèse. Les membranes sont incubées pendant 30 minutes, à température ambiante sous agitation, dans du tampon PBST (PBS 1x, Tween 20 0,1%) contenant 5% de lait écrémé. Elles sont ensuite incubées 18h dans du tampon TBST (Tris pH 7,5 10mM, NaCl 100mM, Tween 20 0,1%) contenant 5% de BSA à 4°C sous agitation, dans une solution d'anticorps primaire, puis lavées 3 fois 10 min dans du tampon TBST avant d'être incubées 1 h dans une solution d'anticorps secondaire anti-souris au 1/ 2 000 ou anti-lapin au 1/5 000 couplés à la peroxydase (DAKO Denmark PM). Après 3 lavages de 10 min dans du TBST et 2 min dans du tampon sans Tween 20, la révélation chimioluminescente est réalisée avec le kit Covalight (Covalab, France. Les anticorps dirigés contre les différentes protéines humaines sont : l'anticorps de lapin anti-Fc γ RIIB dirigé contre la région intra-cytoplasmique du récepteur dilué au 1/2 000 et l'anticorps de souris anti-Fc γ RIIA au 1/ 2 000 (cordialement fourni par M. Jean-Luc Teillaud), l'anticorps de souris (IgG2b) anti-procaspase-8 (Alexis Biochemicals) au 1/1 000, l'anticorps de lapin anti-procaspase-9 (Immunotech-Coulter, France) au 1/2 000, l'anticorps de lapin anti-procaspase-3 (Santa Cruz Biotechnology-TEBU-France) au 1/1 000, l'anticorps de souris (IgG1) anti-Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) au 1/2 000, l'anticorps de

lapin anti-Bid (Cell Signaling Technology) au 1/1000, l'anticorps de lapin anti-AIF au 1/20 000 (Sigma, Missouri, USA), l'anticorps de souris anti-cytochrome c au 1/1000 (BD Biosciences Pharmingen), l'anticorps de lapin anti-COXIV au 1/1 000 (Cell Signaling Technology- OZYME France) , l'anticorps de souris anti-Hsp27 au 1/5000, l'anticorps de souris anti-Hsp70 au 1/5000, l'anticorps de lapin anti-Hsp90 au 1/2500 (cordialement fourni par Dr. S. Khochbin) et l'anticorps de souris anti-actine au 1/10000 (Oncogène).

Pour l'étude de la libération du cytochrome c et de la protéine AIF par la mitochondrie, la séparation des fractions mitochondriale et cytoplasmique des cellules est réalisée avec l'utilisation de la digitonine. Après induction, 5.107 cellules sont prélevées, centrifugées à 400g pendant 5 minutes et lavées dans du PBS 1x. Le volume du culot cellulaire est mesuré et repris dans 5 volumes de tampon de lyse A (HEPES KOH pH7.2 5mM, KCl 10mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 5mM, EGTA 5mM, sucrose 70mM, Mannitol 220mM, AEBSF 1mM, Iodoacetamide 100µM, Leupeptine 10µM, NaF 50mM, Na₃VO₄ 500mM contenant 0,025% de digitonine. Après 5 minutes d'incubation dans la glace le lysat cellulaire est centrifugé à 16.000g à 4°C pendant 2 minutes. Le surnageant récupéré à cette étape contient les protéines du cytosol. Ensuite le culot est repris dans du tampon de lyse B (Triton 1%, Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, EDTA 5mM pH 8, EGTA 0,5mM, AEBSF 1mM, Iodoacetamide 100µM, Leupeptine 10µM, NaF 50mM, Na₃VO₄ 500mM). Après 10 minutes d'incubation dans la glace, le lysat est centrifugé à 16.000g à 4°C pendant 2 minutes. Le surnageant récupéré à cette étape contient les protéines mitochondriales.

1.2. Etude de la phosphorylation du récepteur Fc γ RIIB après homoagrégation

L'étude de la phosphorylation des récepteurs Fc γ RIIB a été réalisée à l'aide de l'anticorps anti-Fc γ RII, FLI 8.26. La dose de 1.0 µg/ml a été utilisée pour le recrutement des récepteurs Fc γ RIIB seuls dans les conditions suivantes:

1. Cellules sans anticorps
2. Cellules + anticorps FLI 8.26 (1.0 µg/ml)
3. Cellules + contrôle isotypique (1.0 µg/ml)

Les cellules sont incubées à 37° pendant 1, 5 ou 30 minutes. Les anticorps suivants ont été utilisés: FLI 8.26: IgG2b κ monoclonal de souris anti-Fc γ RII (BD-Pharmingen-France); IgG2b monoclonal de souris (R&D System, UK Europe).

1.2.1. Immunoprécipitation du récepteur Fc γ RIIB

Après recrutement, l'immunoprécipitation des récepteurs Fc γ RIIB est effectuée à l'aide de microbilles magnétiques couplées à la protéine A (μ MACS Protein A MicroBeads, Myltenyi Biotech, CA, USA). 10×10^6 cellules sont centrifugées à 400g pendant 5 min à 4°C, lavées dans du PBS 2x et lysées dans 1ml de tampon de lyse (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, EDTA 5mM pH 8, EGTA 0,5mM, AEBSF 1mM, Iodoacetamide 100 μ M, Leupeptine 10 μ M, NaF 50mM, Na₃VO₄ 500mM) pendant 20 min dans la glace. Ensuite, le lysat est centrifugé à 13 000 rpm pendant 20 min à 4°C et incubé pendant 30 min dans la glace avec 50 μ l de billes-protéine A. Pour les témoins sans stimulation, l'anticorps FLI 8.26 et l'anticorps isotypique sont ajoutés en même temps à la concentration de 1 μ g/ml. Les protéines retenues sur les billes sont isolées sur micro-colonne avec un champ magnétique. La micro-colonne est placée sur le séparateur magnétique et rincée une fois avec 200 μ l de tampon de lyse. Ensuite le lysat est déposé sur la colonne et celle-ci est rincée 4x avec 200 μ l et 1x avec 100 μ l de tampon de lyse. La colonne est chargée avec 20 μ l de tampon de charge (Tris HCl 50mM pH6.8, DTT 50mM, SDS 1%, bleu de bromophenol 0.005%, glycérol 10%) préchauffée et incubée pendant 5 minutes à 95°C. L'éluat de la colonne est réalisé avec 50 μ l du même tampon de charge. L'éluat est déposé sur gel dénaturant de polyacrilamide à 10% puis transféré sur une membrane de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA), après électrophorèse. Les membranes sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation dans du tampon TBST (TBS 1x, Tween 20 0,1%) contenant 5% de BSA. Elles sont ensuite incubées 18h dans du tampon TBST (Tris pH 7,5 10mM, NaCl 100mM, Tween 20 0,1%) contenant 5% de BSA à 4°C sous agitation, dans une solution d'anticorps primaire, puis lavées 3 fois 5 min dans du tampon TBST avant d'être incubées 1 h dans une solution d'anticorps secondaire anti-souris au 1/ 2 000 ou anti-lapin au 1/5 000 couplés à la peroxydase (DAKO Denmark PM). Après 3 lavages de 5 min dans du TBST et 2 min dans du tampon sans Tween 20, la révélation chimioluminescente est réalisée avec le kit Covalight (Covalab, France). Les anticorps utilisés sont les suivants : l'anticorps de souris (IgG2b κ) anti-phosphotyrosine au 1/1000 (clone 4G10-Upstate Biotechnology,

Euromedex France) et l'anticorps de lapin anti-Fc γ RIIB à la dilution de 1/2 000 (cordialement fourni par M. Jean-Luc Teillaud), dirigé contre la région intra-cytoplasmique du récepteur.

2. Etude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB

2.1. Co-recrutement des récepteurs Fc γ RIIB et BCR

L'étude des réponses cellulaires au co-recrutement des récepteurs Fc γ RIIB et BCR a été réalisée selon le protocole décrit par Sarmay et al (Sarmay et al., 1996). Le recrutement des récepteurs BCR seuls a été effectué à l'aide de l'anticorps fragment F(ab')₂ d'IgG de chèvre anti-IgG + IgM humaine (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA) et le co-recrutement des récepteurs BCR et Fc γ RIIB a été réalisé à l'aide de l'anticorps de souris (IgG2b) anti-IgM humaine (Sigma, Missouri, USA). Les cellules (2×10^7 /ml) sont mises en culture en plaque 6 puits en présence des anticorps pendant différents temps (0, 5', 10' et 30'), en duplicat, dans les conditions suivantes :

1. Cellules sans anticorps
2. Cellules + anticorps anti-IgM F(ab')₂ (10.0 μ g/ml)
3. Cellules + anticorps anti-IgM IgG(10.0 μ g/ml)

2.2. Etude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB par Western Blot

2.2.1. Extraction protéique et Western Blot

L'extraction protéique et le western blot ont été réalisés comme décrit ci-dessus. Les anticorps dirigés contre les différentes protéines humaines sont: l'anticorps de souris (IgG2b κ) anti-phosphotyrosine au 1/1000 (clone 4G10-Upstate Biotechnology, Euromedex France), l'anticorps de lapin anti-Akt1,2 et 3 au 1/500, l'anticorps de lapin anti-Phospho-Akt (ser473) au 1/250, l'anticorps de lapin anti-Erk1/2 au 1/500, l'anticorps de lapin anti-Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) au 1/250 (Cell Signaling Technology-OZYME France) et l'anticorps de souris anti-actine au 1/10000 (Oncogène).

2.2.2. Etude de la phosphorylation du récepteur Fc γ RIIB après co-recrutement par Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation a été réalisée avec des cellules à l'état non stimulé, ainsi qu'après le co-recrutement des récepteurs BCR seuls ou avec le Fc γ RIIB. Ainsi, 10 x10⁶ cellules sont centrifugées à 400g pendant 5 minutes à 4°C, lavées au PBS 2x et lysées dans 1ml de tampon de lyse (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, EDTA 5mM pH 8, EGTA 0,5mM, AEBSF 1mM, Iodoacetamide 100 μ M, Leupeptine 10 μ M, NaF 50mM, Na₃VO₄ 500mM) pendant 20 min dans la glace. Ensuite, le lysat est centrifugé à 13 000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est incubé avec l'anticorps anti-Fc γ RIIB, FLI 8.26 ou avec le contrôle isotypique à la concentration de 2 μ g/ml en présence de 50 μ l de microbilles pendant 30 minutes dans la glace. Ensuite l'immunoprécipitation de protéines ainsi que le western blot sont réalisés comme décrit ci-dessus.

V. TRANSFECTIONS

1. Préparation des clones stables

Les cDNA Fc γ RIIB correspondant aux isoformes Fc γ RIIb1 et b2 humains ont été obtenus par RT-PCR sur les ARN totaux des lignées BR97 et B593 respectivement, à l'aide des couples d'amorces suivants: 5' CTAGCA**AAGCTT**ACCATGGGAATCCTGTC 3' et 5' CTAGC**GAATTCA**ATACGGTTCTGGTCATC 3' et clonés comme un fragment XbaI – EcoRI dans le vecteur pcDNA3.1-HA. Les sites de restrictions HindIII et EcoRI sont indiqués en gras. L'épitope HA (Hemaglutinine) a été rajouté au vecteur pcDNA3.1 en utilisant les oligomères suivants:

(sens) 5' GATC**GAATTCT**ACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTAGT**CTAGAG**ATC 3'

(anti-sens) 5' GATC**CTAGACT**AGGCATAATCCGGCACATCATAAGGGT**AGAA**TTTCGATC 3'.

Les sites EcoRI et XbaI sont indiqués en gras. Pour ligation, ces oligos ont été resuspendus à raison de 1 μ g / ml, puis 10 μ g de chaque oligo dénaturé (à 100°C) et « re-annealés ». Les fragments annealés sont ensuite digérés par EcoRI et XbaI, purifiés par Phenol / Chloroform, précipités et resuspendus dans du T.E 10 :1. Les produits digérés ont servi à la ligation dans pcDNA3.1.

Les cellules de la lignée BA/F3 sont transfectées par électroporation (Biorad-Gene-Pulser-400V/975 μ F) en utilisant 20 μ g de vecteur / 0.5x10⁷ cellules. Parallèlement un témoin « vecteur vide » et un témoin d'efficacité de transfection (GFP) ont été inclus. A 48h les cellules sont récupérées et marquées à l'aide d'un anticorps anti-Fc γ RII pour évaluer l'expression membranaire du récepteur. Un lysat cellulaire total pour analyser de l'expression de la protéine par Western Blot est réalisé. Les cellules sont ensuite repiquées dans un milieu contenant du G418 (1mg/ml) permettant la sélection des cellules transfectées. La dose de sélection a été déterminée par l'étude de la sensibilité de la lignée BA/F3 non transfectée, à des doses croissantes de G418 pendant 5 jours. Les cultures sont maintenues en présence de G418 pendant 15 jours. A J15, une nouvelle évaluation de l'expression membranaire et intra-cellulaire de Fc γ RII est réalisée. La technique de dilution limite, à raison de 0.5 cellules par puits, est utilisée pour sélectionner les clones stables BA/F3-Fc γ RIIb1 et BA/F3-Fc γ RIIb2.

RESULTATS

1. ARTICLE : FcγRIIB INDUCES CELL DEATH IN HUMAN B LYMPHOMA CELLS.

Triggering of novel caspase-dependent and -independent cell death responses by anti-FcγRII antibody stimulation in human B lymphoma cells

Ribeyron J, Lajmanovich A, Fournier A, Florin A, Mossuz P, Pasquier M, Falcon L, Duley S, Bonnefoix T, Teillaud JL, Leroux D and Callanan M.

En cours de soumission à Leukemia.

1. Objectifs

La dérégulation de l'expression de Fc γ RIIB a été identifiée comme conséquence des translocations chromosomiques affectant le gène *FCGR2B* dans des hémopathies malignes (lymphome folliculaire, leucémie lymphoblastique aiguë). Afin d'étudier si la mort cellulaire Fc γ RIIB-dépendante est affectée lors de ce processus nous avons caractérisé le phénomène de mort cellulaire dans un modèle de lignée de lymphome folliculaire humain, la lignée B593 - t(1 ;22).

2. Résultats

Tout d'abord nous avons analysé l'expression du récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593 comparée à d'autres lignées de lymphome B (BL41 et Daudi), ainsi qu'à des lymphocytes B spléniques normaux. Comme attendu, l'analyse par cytométrie en flux, à l'aide de l'anticorps FLI 8.26, révèle la forte expression de Fc γ RIIB dans la lignée B593 comparée aux lignées BL41 et Daudi et aux lymphocytes B normaux.

Nous avons ensuite étudié la mort cellulaire induite par Fc γ RII après traitement avec l'anticorps FLI 8.26. La mort cellulaire induite par FLI 8.26 dans la lignée B593 se révèle comme étant temps et dose dépendantes. Nous avons observé la mort présente dès 0.5h (21% de cellules mortes) après traitement et elle atteint un maximum de 85% à 48h avec la dose de 10 μ g/ml. Nous avons montré également que le traitement par FLI 8.26 (10 μ g/ml, 48h) a induit la mort cellulaire dans les lignées BL41 et Daudi, cependant la lignée Daudi se présente comme moins sensible comparée aux deux autres lignées. D'une manière intéressante, les lymphocytes B normaux sont résistants à la mort cellulaire induite par FLI 8.26.

Nous avons ensuite caractérisé le phénomène de mort cellulaire dans la lignée B593 après traitement par FLI 8.26. A travers l'utilisation de l'inhibiteur global de caspases, z-VAD-fmk, nous avons montré que la mort cellulaire est caractérisée par une voie caspase dépendante et une voie caspase indépendante.

A la concentration de FLI 8.26 la plus élevée (10 μ g/ml), nous avons ensuite montré par des analyses en western blot que la mort cellulaire caspase dépendante est caractérisé par

l'activation de la caspase-3, ainsi que le clivage de la PARP. En outre, nos résultats suggèrent un défaut d'activation de la caspase-9, malgré son clivage et la libération du cytochrome c, au cours de la mort cellulaire induite par FLI 8.26 dans la lignée B593. D'une manière intéressante, le traitement par FLI 8.26 des cellules de la lignée B593 induit l'expression de la protéine de choc thermique, HSP27. Celle-ci pourrait donc réguler les fonctions pro-apoptotique du cytochrome c.

Nous avons ensuite étudié la voie caspase indépendante empruntée par les cellules de la lignée B593, après traitement par l'anticorps FLI 8.26 à une dose 10 fois plus faible (1 μ g/ml). Nous avons alors observé que la molécule clé dans cette voie est la protéine AIF. La libération d'AIF dans le cytosol est concomitante avec la perte du potentiel de la membrane mitochondriale. De plus, les cellules de la lignée B593 où la protéine AIF est cytosolique ne montrent pas de condensation de la chromatine, ni de fragmentation de l'ADN.

Nous avons étudié l'état de phosphorylation de Fc γ RIIB après traitement par FLI 8.26 dans la lignée B593. Nous avons montré par des expériences d'immuno-précipitation que la phosphorylation de Fc γ RIIB est un phénomène précoce au cours de la mort cellulaire FLI 8.26 induite dans la lignée B593.

3. Conclusions

Notre étude a montré que l'anticorps anti-Fc γ RII, FLI 8.26 induit la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante de cellules tumorales et n'induit pas la mort de lymphocytes B normaux. Ce processus implique la phosphorylation du récepteur Fc γ RIIB, l'activité de caspases et/ou la libération par la mitochondrie de la protéine AIF dans le cytosol. Nos résultats ont montré pour la première fois les mécanismes de mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante dans les lymphomes B humains. Nous suggérons que cette nouvelle voie de mort cellulaire pourrait être exploitée dans une perspective thérapeutique.

Triggering of novel caspase-dependent and -independent cell death responses by anti-FcγRII antibody stimulation in human B lymphoma cells

Ribeyron J¹, Lajmanovich A¹, Fournier A¹, Florin A¹, Mossuz P¹, Pasquier M¹, Falcon L¹, Duley S¹, Bonnefoix T¹, Teillaud JL², Leroux D¹ and Callanan M¹.

¹Lymphoma Research Group, INSERM E353, IFR73, Institut Albert Bonniot – Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier Grenoble 1, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France

²Unite INSERM 255, IFR58, Université Rene Descartes-Paris 5, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherches Biomedicales des Cordeliers, Paris, France.

Correspondence : Mary Callanan, Lymphoma Research Group, INSERM E353, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier Grenoble 1, Domaine de la Merci, 38706 LA TRONCHE Cedex, France. Telephone : (33) 476549430, FAX (33) 476549413. E-mail ; mary.callanan@ujf-grenoble.fr

Running Title : FcγRIIB-induced apoptosis in lymphoma B cells

Key words : B-cell lymphoma, anti-FcγRII antibodies, cell death, FcγRIIB, caspases, AIF

Abstract : 195 words

ABSTRACT

Fc γ RIIB the low-affinity inhibitory receptor for IgG, is the predominant Fc receptor (FcR) present on B cells and has thus been proposed as a potentially novel target for monoclonal antibody therapy in lymphoma. Here, we provide new evidence demonstrating that stimulation by an anti-Fc γ RII antibody, FLI 8.26, can induce cell death in tumour but not normal B cells. This cell death can proceed via both caspase dependent and independent pathways depending on the tumour cell type. The former involved cytochrome C release, caspase 3, 9 and PARP cleavage while the latter was associated with release of the mitochondrial protein apoptosis-inducing factor (AIF). Moreover, Fc γ RIIB receptor phosphorylation was found to be an early signalling event in this cell death pathway thereby pointing to Fc γ RIIB as a key effector for FLI 8.26-mediated apoptosis in tumour B cells. Interestingly, FLI 8.26 antibody treatment also modulated expression of HSP27, a small heat shock protein implicated in the regulation of the proapoptotic activity of cytochrome C. Taken together these findings show that anti-Fc γ RII antibody treatment can induce specific caspase-dependent and independent lymphoma cell death. We propose that this novel cell death pathway offers potential for therapeutic exploitation in lymphoma treatment.

INTRODUCTION

B lymphocyte function is tightly controlled by the coordinate action of multiple cell surface receptors including those that belong to the immunoglobulin receptor superfamily. These receptors function in activatory or inhibitory signalling. The basis of these opposing functions in lymphocytes is centered on the signalling properties of the respective receptors. Activatory receptors include the B and T lymphocyte antigen receptors (BCR and TCR, respectively) and receptors for immunoglobulin Fc fragments (Fc γ R). Activatory signalling by the BCR, TCR and

activatory Fc γ R is mediated by immuno-receptor tyrosine-based activation motifs either on the receptor itself or on associated signalling chains. Inhibitory signalling is mediated by members of the immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) family of receptors. This family of receptors of which the founding member is Fc γ RIIB is defined by the presence of a conserved intra-cytoplasmic ITIM (Ile/Val/Leu/Ser-X-Tyr-XX-X(Leu/Val) where X denotes any amino acid motif located on either on the receptor itself or on associated signalling chain (1).

The biochemical basis of ITIM function has been characterised in some detail. In particular, negative signalling by Fc γ RIIB occurs under conditions of co-recruitment with an ITAM bearing receptor such as the BCR on B lymphocytes or the ITAM bearing Fc γ RIIA in macrophages. It involves phosphorylation of the ITIM tyrosine, recruitment of the SH2 domain-containing inositol phosphatase SHIP, subsequent phosphorylation of p62Dok and consequent dampening of the BCR response (1).

Fc γ RIIB has also been shown to deliver a pro-apoptotic signal under conditions of homo-aggregation in mature murine B cells (2). This pro-apoptotic response requires an intact Fc γ RIIB transmembrane domain, is ITIM-motif independent and is abrogated by recruitment of the inositol phosphatase SHIP to the phospho-ITIM. A requirement for expression of the pleckstrin homology domain containing kinase, Btk, has also been reported. An earlier report indicated the capacity of co-stimulation with certain mitogens (LPS, IL4...) and / or concomitant transgene-driven expression of BCL2 to abrogate Fc γ RIIB-dependant cell death signalling(3). More recently, Fc γ RIIB-induced cell death has been shown to involve Abl family kinase-mediated (c-AbL and ARG) receptor phosphorylation on non-ITIM tyrosine residues and to be caspase 3 and 9 dependant(4). This pro-apoptotic signalling pathway has been proposed to function as part of a negative selection mechanism for elimination of low affinity antigen binding germinal center B

cells(2). Alternatively, it has been proposed that Fc γ RIIB-induced cell death acts as a 'peripheral' checkpoint mechanism to down regulate antibody production (by Fc γ RII-induced apoptosis of plasma cells) (5, 6). To date this mechanism has not been investigated in human B cells.

We and others have shown deregulated expression of Fc γ RIIB as a consequence of chromosomal translocation in malignant lymphoma (7, 8). Fc γ RIIB deregulation has also been described in an unusual case of acute leukemia(9). Strikingly, these translocations are consistently observed in cases that also show BCL2 deregulation through t(14;18) translocations which tends to suggest a functional link between these two events in a common oncogenetic pathway. More recently, immunohistochemistry has identified Fc γ RIIB (also known as CD32B) expression in a broad range of B-cell non-Hodgkins lymphoma (60/112 cases; 54%). Interestingly, within this series, all mantle cell lymphomas (MCLs; 5 of 5), splenic marginal zone (8 of 8), and small lymphocytic lymphomas (7 of 7) were positive for Fc γ RIIB / CD32B, whereas roughly half (13 of 24) of FLs examined showed expression(10). In this setting, we have examined here, for the first time, the cellular and molecular sequelae of anti-Fc γ RII antibody (FLI 8.26) treatment on cell survival in human normal and tumour B cells.

MATERIEL AND METHODS

Cells and culture conditions

Normal human spleen B lymphocytes were isolated as described described (11). B593 cells were described previously (7, 12). BL41, Daudi and U937 cells were obtained from the ATCC. Cell lines were cultured in RPMI 1640 Glutamax medium supplemented with either 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) supplemented with 100 μ g/ml penicilin-streptomycin, 1.4mM

sodium pyruvate and 1.4mM non-essential aminoacids. All reagents were from GIBCO BRL, Rockville, MD, USA. Cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere).

Reagents

Caspase inhibitor ZVAD-fmk (Calbiochem) was diluted in DMSO and used at concentrations between 5 and 100nM. Cells were pre-incubated for 2h at 37°C in the presence of inhibitor prior to addition of either anti-Fc_γRII or anti-FAS antibodies (see below). Other reagents used were 3,3 dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6[3]) and propidium iodide (Molecular Probes). All reagents were utilised at non-toxic doses. To avoid cytotoxic effects when dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as vehicle, DMSO concentrations that did not exceed 1/1000 (v/v) were used.

Culture conditions and induction of cell death

Cell lines were cultivated in RPMI supplemented with 10% FCS, 2mM Glutamine, 2mM non-essential amino acids, 2% pyruvate and antibiotics. Fc_γRII-dependant cell death was assayed by incubating cells at a density of 0.5 x 10⁶/ml in 3ml of medium with 10μg/ml of the previously described anti-hFc_γRIIA/B mouse monoclonal IgG2b antibody, FLI 8.26(13) from 4 to 48h (most assays performed at 48h). As a control, cells were processed in the same way and treated with an isotype control mouse IgG2b antibody (BD-Pharmingen, France). Caspase inhibition tests were carried out in identical conditions except that cells were induced following preincubation with Z-VAD-fmk (100nM).

Cell death analysis

Cultures were performed in RPMI supplemented medium at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. 0.5 x 10⁶ B593 cells/ml were treated with, mAb FLI 8.26 10μg/ml, mAb CH-11 50ng/ml, STS 1μM and Isotype control IgG2b 1μg/ml for 2 to 48 hours. Also as required, 0.5 x

10⁶ Jurkat cells/ml were treated with the CH-11 250ng/ml, STS 1 μ M and for 2 to 48 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Apoptotic cells were quantified in each experimental condition by annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) / propidium iodide (PI) double staining using the Apotest (Immunotech) as indicated by the manufacturer. Briefly, treated or untreated cells (0.5 x 10⁶) were washed in ice-cold PBS and incubated in 100 μ l binding buffer containing annexin V-FITC and 2.5 μ g/ml PI. After 10 minutes incubation on ice in the dark, 400 μ l of binding buffer were added and the samples were immediately analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), San Jose, CA). Early apoptotic cells were annexinV-FITC positive and PI-negative. Late apoptotic cells were annexinV-FITC- and PI- positive. The results were expressed as percentage of specific apoptosis as follows: [(% apoptotic treated cells - % apoptotic untreated cells) / (100 - % apoptotic untreated cells)] x 100.

The detection of apoptosis-associated alterations in $\Delta\Psi_m$ were measured using DiOC6. Treated or untreated cells (5 x 10⁵) were washed in ice-cold PBS and were resuspended in 500 μ l of RPMI supplemented with 2% heat-inactivated FCS containing 400nM DiOC6(3) and 2.5 μ g / ml PI. After 15 minutes incubation at 37°C in the dark, the cells were immediately analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), San Jose, CA).

Western Blot analysis

FLI 8.26-treated and untreated cells were washed in ice-cold PBS and lysed in 1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM AEBSF, 100 μ M iodoacetamide, 10 μ M leupeptin, 50mM NaF and 500mM Na₃VO₄ for 30 minutes on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 13,000 rpm at 4°C. Protein concentration was determined by the BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, IL, USA). For western blotting, 15 μ g of protein lysate were loaded on

10% SDS/PAGE gels, electrophoresed and transferred to PVDF membranes (Milipore, St Quentin- Yvelines, France). The membranes were blocked by incubating for 30 minutes in PBS, 5% nonfat milk, 0.1% Tween 20 buffer at room temperature, then incubated overnight at 4°C with the appropriate primary and secondary antibodies as follows at the dilutions indicated : rabbit polyclonal anti-Fc γ RIIB antibody (1/1000 dilution, JL Teillaud), mouse anti-PARP monoclonal antibody (BD Pharmingen, 1/2,000), mouse anti caspase 8 monoclonal (Santa cruz Biotechnology ; 1/1000) or rabbit polyclonal anti-caspase 9 and 3 antibodies (Alexis Biochemicals and Immunotech-Coulter, respectively) at 1/2000 or 1/1000, respectively, rabbit anti-AIF antibody (Sigma, 1/20,000), mouse anti-cytochrome c antibody (BD Biocsciences Pharmingen; 1/1000), rabbit anti-HSP27, 70 and 90 antibodies (gift from Dr S Khochbin, INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France ; 1/5000 (anti-HSP27 and HSP70, respectively and 1/2500), anti-COXIV antibody (Cell Signalling Technology, Ozyme, France ; 1/1000), mouse anti-phospho-tyrosine monoclonal antibody 4G10 (Upstate Biotechnology, Euromedex, France). Blots were re-probed with anti-actin antibody (Oncogene, dilution) to control for equal protein loading. After washes in PBS, 0.1% Tween 20, the membranes were incubated for 30 minutes at room temperature with appropriate secondary antibodies. After washes in 1X PBS, 0.1% Tween 20 bound antibodies were visualized with an enhanced chemiluminescence detection system as specified by the manufacturer (ECL Western Blotting Detection System, Amersham).

Assessment of nuclear morphology and internucleosomal DNA fragmentation

Chromatin condensation and internucleosomal DNA fragmentation were assessed by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and the Enhanced Apoptotic DNA Ladder Detection (MBL), respectively. Briefly, for DAPI staining, cells were induced to undergo FLI 8.26-dependent apoptosis as described, were cytocentrifuged onto glass slides, stained with DAPI, mounted in VectaShield antifade and observed by fluorescence microscopy. Images were

captured with a CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ) and SmartCapture software (Vysis, Voisin le Bretonneux, France).

For DNA fragmentation analysis, DNA from 5 to 10 x 10⁵ cells treated to undergo apoptosis as described were dissolved in 20µl of DNA suspension buffer as indicated in the Enhanced Apoptotic DNA Ladder Detection kit (MBL) and electrophoretically resolved in a 2% agarose gel. After incubation of the gel in distilled water containing 0.5 µg/mL ethidium bromide for 30 minutes, fragmented DNA was visualized under ultraviolet light.

For both nuclear morphology and DNA fragmentation assays, treated and non-treated negative and positive controls were processed in parallel. In particular, induction of FAS-dependent apoptosis using the anti-FAS antibody, CH11, was performed as a positive control for apoptotic chromatin and DNA fragmentation as described previously(14).

Apoptosis-inducing factor (AIF)

AIF and cytochrome c release were examined through cell fractionation and immunoblotting using polyclonal anti-AIF antibody (Sigma). Briefly, for cytosol isolation, a modified technique based on digitonin subcellular fractionation was used. This consisted in cell lysis for 5 minutes on ice in lysis buffer containing 5mM HEPES KOH pH 7.2, 10mM KCL, 2mM MgCL₂, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 70mM sucrose, 220mM mannitol, 1mM AEBSF, 100uM iodoacetamide, 10uM leupeptine, 50mM NaF, 500mM NA₃VO₄ and 0.025 % digitonin. Cell lysates were centrifuged at 16,000 g for 2 minutes at 4°C and the supernatant, corresponding to the cytosolic fraction, recovered. The cell pellet was further lysed in 1% triton X100, 50mM Tris-HCL pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8.0, 0.5mM EGTA, 1mM AEBSF, 100µM iodoacetamide, 10µM leupeptine, 50mM NaF, 500mM NA₃VO₄. The resulting protein lysate corresponds to mitochondrial fractions. Lysates were then processed for western blotting with anti-AIF or

cytochrome c antibodies as described above. Probing with anti-COXIV antibody was used to establish that cytosolic fractions were free of contaminating mitochondria.

Analysis of FcγRIIB phosphorylation status

For analysis of the phosphorylation status of FcγRII receptors in B593 cells following FLI 8.26 treatment, receptors were immunoprecipitated using sepharose A-coupled magnetic beads (μMACS protein A MicroBeads, Miltenyi Biotech, CA, USA) according to suppliers instructions. Briefly, 10×10^6 cells were lysed in 1mL of lysis buffer (1% Triton X100, 50mM Tris-HCL pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8.0, 0.5mM EGTA, 1mM AEBSF, 100μM iodoacetamide, 10μM leupeptine, 50mM NaF, 500mM Na_3VO_4) for 20 minutes on ice. Lysates were then spun at 13,000 rpm for 20 minutes at 4°C and incubated directly with 50μl of protein A-coupled magnetic microbeads for 30 minutes on ice. Immune complexes were magnetically recovered on Miltenyi columns. Following mild washes to remove unbound proteins immune complexes were eluted in 70μl of pre-heated loading buffer (50mM Tris-HCL pH 6.8, 50mM DTT, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol) and processed for western blotting as described above. B593 cells stimulated with isotype control antibody were processed in the same manner except that FLI 8.26 antibody was added post-lysis at a concentration of 1μg / ml. The phosphorylation status of FcγRIIB was assessed by sequential western blotting with anti-phospho-tyrosine and anti-FcγRIIB antibodies (JL Teillaud).

RESULTS

Flow cytometric assessment of FcγRII expression in human B cell lymphoma lines.

As a first step to assessing the potential pro-apoptotic activity of anti-FcγRII antibodies in tumour B cells we examined membrane expression of FcγRII receptors by flow cytometry using the anti-FcγRIIA/B antibody, FLI 8.26, in BL41, Daudi and B593 (harbours a t(1;22)/ *FCGR2B* translocation) lymphoma B-cells and normal spleen-derived B cells. As expected, B593 showed markedly higher FcγRII expression compared to the BL41 and Daudi cells ; mean fluorescence intensity (MFI) for B593 cells was 1,640 compared to 232 and 131 for Daudi and BL41 cells, respectively (Fig. 1). Normal B lymphocytes showed expression levels (MFI, 115) that were comparable to those in BL41 cells.

FLI 8.26 treatment induces cell death in human B lymphoma cells

To test responses to FcγRII stimulation, normal and tumour B-cells were stimulated with the anti-FcγRIIA/B antibody, FLI 8.26, analogously to previously described FcγRII-dependent cell death experiments in murine B lymphocytes (2, 15). The effect of FLI 8.26 stimulation on B-cell survival was monitored by flow cytometric assessment of phosphatidyl serine (PS) exposure (annexin V) and membrane damage (propidium iodide influx) both of which are events that are associated with apoptotic cell death.

Initial studies in B593 revealed a time and dose-dependant FLI 8.26-induced cell death response that was evident as early as 0.5h (15% cell death) post-FcγRII ligation by FLI 8.26. Cell death reached a maximum of 84% following 48h FLI 8.26 treatment at 10μg / ml. Interestingly, dose-dependent differences in FLI 8.26-induced cell death responses in B593 cells were most marked following 48h incubation (84% cell death at 10μg / ml FLI 8.26 versus 58% cell death at 1μg / ml) compared to 65 and 40% cell death for the same FLI 8.26 doses, respectively, at 24h (Fig. 2A). Also, early PS exposure and propidium iodide influx, visible at 2h following FLI 8.26 treatment, was a feature of FLI 8.26-induced cell death in B593 cells although the B593 cell line has been shown to present similar AnV / IP staining patterns during FAS-

induced apoptosis (14) (Fig. 2B). This cell death response was specific since no response was observed with isotype control IgG antibody (Fig. 2A, B).

FLI 8.26 treatment (10ug/ml, for 48h) but not isotype control IgG also induced a cell death in both Daudi and BL41 cells (Fig. 2C). Interestingly, Daudi cells were more resistant to FLI 8.26-induced cell death (only 37% cell death compared to 76% and 84% cell death in BL41 and B593 cells, respectively). Significantly, normal human B lymphocytes, purified from spleen, did not undergo cell death on treatment with FLI 8.26. These data indicated that ligation of Fc γ RII receptors by FLI 8.26 induces a specific time and dose-dependent cell death response in B lymphoma lines but not in normal B cells.

Fc γ RII-dependant cell death proceeds via both caspase-independent and caspase-dependent pathways

We next investigated caspase involvement in Fc γ RII-dependent cell death in B593, Daudi and BL41 cells. As shown in Figure 3A, ZVAD-fmk (100 μ M) treatment - a concentration that is sufficient to inhibit caspases - offered significant protection from FLI 8.26 cell death in the 3 cell lines. However, we noticed that this protection was incomplete in B593 cells (cell death reduced from 86% to 45% at 48h treatment with FLI 8.26 at 10ug/ml). In particular, ZVAD-fmk provided little or no protection from FLI 8.26-induced cell death at the lower dose of 1ug/ml FLI 8.26 at either time point.

Subsequently, western blotting was used to identify caspases potentially involved in FLI 8.26-induced cell death. Caspase 9, 3 and PARP-1 cleavage were observed in B593 and BL41(Fig. 3B and C) cells treated with FLI 8.26 (10 μ g/ml for 48h). Interestingly, caspase 9 cleavage was delayed in B593 compared to BL41 cells (Fig. 3B and C). Also, caspase 8 cleavage was not observed in either cell line (Fig. 3B and C). These results indicated that

treatment of lymphoma B with FLI 8.26 can induce both both caspase-dependent (involving cleavage of caspases 9, 3 and PARP-1) and independent cell death.

Assessment of nuclear morphology and internucleosomal DNA fragmentation in FcγRII-dependent apoptosis

Chromatin condensation and oligo-nucleosomal DNA fragmentation are late features of apoptotic cell death. Thus to further characterise FLI 8.26-dependent cell death in B593 and BL41 cells, we looked for evidence of chromatin condensation by DAPI staining and DNA oligonucleosomal fragmentation by agarose gel electrophoresis (B593 cells only).

Nuclear morphology indicated the occurrence of apoptotic cell death in both B593 and BL41 cells treated with FLI 8.26 at 10 μ g/ml ; cell nuclei showed clumped and fragmented chromatin. Interesting, in B593 cells this apoptotic nuclear morphology was not observed in cells treated with lower doses of FLI 8.26 or indeed at earlier time points in cells treated with FLI 8.26 at 10 μ g/ml where non-caspase dependent cell death predominates. In keeping with this, marked DNA fragmentation was observed at both the 24 and 48h time points in B593 cells treated with 10 μ g/ml FLI 8.26 but not in B593 cells treated with FLI 8.26 at 1 μ g/ml for 24h (predominantly caspase-independent cell death). Although, the DNA fragmentation pattern observed in B593 cells treated with FLI 8.26 appeared to differ from that observed following treatment with anti-FAS antibodies it was successfully blocked by ZVAD-fmk treatment thereby indicating a requirement for caspase activity in this event.

FLI 8.26-induced cell death thus occurred by at least two pathways ; an apoptosis-like caspase-dependent pathway that induces chromatin condensation and DNA fragmentation and an alternative pathway, which predominates at either lower treatment doses of FLI 8.26 (1 μ g/ml)

or earlier time points during treatment with higher doses (10 $\mu\text{g/ml}$), that does not induce these changes.

FLI 8.26-induced cell death in B593 cells is associated with mitochondrial membrane potential loss and cytosolic release of AIF and cytochrome C.

A key step of the apoptosis cascade is the permeabilisation of the outer mitochondrial membrane leading to the release of soluble intermembrane proteins such as cytochrome c and AIF which are key regulators of caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways, respectively(16). As a first step to evaluating involvement of the mitochondrial pathway in the control of Fc γ RII-dependent cell death, we investigated the integrity of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) following FLI 8.26 treatment in B593 cells. This was measured by flow cytometry using the fluorescent dye DiOC6. A drop in mitochondrial membrane potential as evidenced by decreased DiOC6 staining was evident in 17% cells at 24h and this increased to 50% at 48h in B593 cells treated with FLI 8.26 at 1 $\mu\text{g/ml}$ whereas cells treated with FLI 8.26 at 10 $\mu\text{g/ml}$ showed $\Delta\Psi_m$ of 23 and 79%, respectively (Fig. 5A, B). Most, but not all cells showing $\Delta\Psi_m$ were also positive for propidium iodide (Fig. 5A). Treatment of B593 cells with doses of ZVAD-fmk that inhibit caspases provided no or only slight protection from $\Delta\Psi_m$ loss at the 24h timepoint (Fig. 5A and B). This indicated that FLI 8.26-induced mitochondrial membrane potential loss initially occurs upstream of caspase activation. However, at the 48h time point, ZVAD-fmk treatment offered partial protection from mitochondrial membrane potential loss thereby indicating a role for caspase activity in loss of mitochondrial function in the late stages of FLI 8.26-induced cell death (Fig. 5A and B).

We next used cell fractionation and immunoblotting to check cytochrome C and AIF release in B593 cells treated with FLI 8.26 at 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Fig. 5C). Interestingly, AIF and cytochrome c release into the cytosol was apparent from 24h onwards. Furthermore,

the release of these proteins was not significantly inhibited by ZVAD treatment indicating these events to occur upstream of caspase activation (Fig. 5C). Absence of COXIV in all cytosolic fractions examined confirmed that our preparations were free of mitochondrial contamination (Fig. 5C).

Modulation of hsp27 is associated with fli 8.26 treatment in lymphoma cells.

As FLI 8.26 stimulation in B593 cells results in cytochrome c release without evidence of caspase 9 activation (either caspase 9 cleavage or cell death inhibition by caspase 9 inhibitors) at the early time points in cell death induction we determined the expression levels of chaperone proteins (HSP27, 70 and 90) that are known to regulate the pro-apoptotic functions of cytochrome c (16, 17) (Fig. 6A). Marked, time-dependent upregulation of HSP27 expression was observed in B593 cells treated with FLI 8.26 at 10 μ g / ml (visible from 4h onwards, Fig. 6A). In addition, HSP70 and 90 expression was constitutive in B593 cells but was not further induced by FLI 8.26 treatment (Fig. 6A). Interestingly, FLI 8.26 treatment also modulated HSP27 expression in BL41 cells. In these cells, constitutive HSP27, 70 and 90 expression was observed and FLI 8.26-mediated stimulation of Fc γ RIIB receptors - but not isotype control antibodies - provoked marked downregulation of HSP27 (Fig. 6B). These data indicate a potentially novel role for FLI 8.26 antibodies / Fc γ RII receptors in the regulation of HSP27 in B lymphoma cells.

Fc γ RIIB phosphorylation is an early event in Fc γ RII-induced cell death in lymphoma cells

Since Fc γ RIIB signalling is associated with receptor phosphorylation we asked whether this is the case in Fc γ RII-dependent cell death. Remarkably, immunoprecipitation of Fc γ RII receptors, in FLI 8.26-treated B593 cells, revealed strong dose-dependent Fc γ RIIB phosphorylation as early as 5 minutes after stimulation with FLI 8.26 antibodies – but not isotype control IgG - and this appeared to peak at 30 minutes post stimulation (Fig. 7). This indicated that Fc γ RIIB phosphorylation is an early event in FLI 8.26-induced cell death involves in lymphoma B cells.

DISCUSSION

In this report, we provide new evidence that identifies FcγRII receptors on human B lymphoma cells as potentially novel targets for selective induction of tumour cell death by anti-FcγRII antibody therapy. Specifically, we show that stimulation of FcγRII-expressing human B lymphoma cells – but not normal human splenic B cells - by the anti-FcγRIIA/B antibody, FLI 8.26, induces apoptotic cell death. This cell death proceeds via both caspase dependent and independent pathways that involve caspase 3 activation and release of an important regulator of caspase independent cell death, AIF, respectively. Moreover, FcγRIIB receptor phosphorylation is an early event in this signalling pathway thereby pointing to FcγRIIB as a key effector for induction of FLI 8.26-mediated apoptosis in tumour B cells.

FcγRIIB is a well characterized inhibitory receptor that functions in B cells to regulate the antigen-driven activation and expansion of cells. When coligated to the BCR the FcγRIIB1 blocks BCR signaling and when coligated independently of the BCR, FcγRIIB1 has been shown to induce apoptosis by an ITIM-independent mechanism(6). More recently, this cell death pathway was shown to involve ABL-family kinase-mediated receptor phosphorylation, cell cycle arrest, caspase activation (notably caspases 3 and 9) as well as PARP cleavage(4). The present report constitutes the first investigation of this cell death pathway in human B cells.

We demonstrate that as in mouse B cells the FcγRII colligation induces (FcγRIIB phosphorylation, caspase 9 and 3 but significantly, not caspase 8 cleavage). This cell death response appears to involve FcγRIIB phosphorylation and to be initiated at the mitochondrial level ; mitochondrial membrane potential loss associated with caspase 9 and 3 cleavage was an early, caspase-independent event associated with FcγRII-dependent cell death. In addition, cytosolic release of AIF and cell death without evidence of chromatin condensation and DNA fragmentation – features that are typical of AIF regulated cell death pathways(18, 19) – were observed in FLI 8.26-treated B593 cells thereby demonstrating the existence of previously

unknown caspase-independent FcγRII(B)-dependent cell death pathway. These findings are of particular interest since FcγRIIB-dependent cell death has been proposed as a key mediator of B lymphocyte negative selection in germinal center reactions (elimination of autoreactive B cells) and to regulate a peripheral B-cell differentiation checkpoint pathway whose function is to remove long-lived antibody producing plasma cells(6). It will be important to identify the involved receptor-proximal events (ITIM or non-ITIM tyrosine phosphorylation and/or Abl family kinase involvement...(4)) and to further examine the respective contributions of caspase-independent, AIF-dependent versus caspase-dependent FcγRIIB-dependent cell death pathways in the control of B cell survival. In any case, these pathways are likely to be tightly regulated : in our hands stimulation of FcγRII receptors by FLI 8.26 treatment in normal B lymphocytes did not result in cell death *in vitro*.

FLI 8.26-dependent caspase-independent or dependent cell death signalling appear to be differentially engaged depending on the cellular context. Indeed, in BL41 cells caspase-dependent apoptosis predominated whereas in B593 cells cell death appeared to occur in a 'biphasic' manner by both caspase-independent and dependent mechanisms.

Interestingly, in B593 cells, caspase 9 cleavage occurred relatively late compared to BL41 cells and appeared to be significantly delayed with respect to cytochrome *c* release thereby suggesting inefficient or impaired of caspase 9 activation in these cells. Indeed, use of a caspase 9 inhibitor did not protect against FLI 8.26-induced cell death in the B593 cell line. In this setting, it is significant, that upregulation of the small heat shock protein, HSP27, which has been shown to inhibit cytochrome C-mediated caspase activation in the cytosol was an early event associated to FLI 8.26 treatment in B593 cells (17). Somewhat remarkably, this marked HSP27 induction was partially relieved by treatment with the pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk thereby suggesting involvement of novel caspase-dependent mechanisms in this phenomenon, at least in this cellular model. It is also noteworthy that FLI 8.26 treatment did not alter expression levels of either HSP70 and 90 which are constitutively expressed in B593 cells.

Finally, modulation of HSP27 expression following FLI 8.26 treatment appears to depend on cellular context since in BL41 cells which show constitutive expression of HSP27, HSP70 and 90, FLI 8.26 treatment resulted in marked downregulation of HSP27. Taken together, these data point to a role for anti-FcγRII antibodies / FcγRII receptors in the modulation of HSP27 expression in lymphoma cells. It will be of interest to characterise the role of HSP27 and indeed other factors (including other HSPs, IAP family members...) in differential sensitivity to FcγRII-dependent caspase –dependent and independent cell death signalling.

Monoclonal antibody therapy has become a major tool for cancer treatment. Mechanisms of action include activation of death pathways within the tumor cells, complement-mediated cell killing, antibody-mediated delivery of cytotoxic agents to the tumor cells, as well as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)(20). Immunohistochemical and expression studies have identified FcγRIIB / CD32B expression in a variety of B-cell malignancies, suggesting that FcγRIIB is a potential immunotherapeutic target for B-cell malignancies(10). In this setting, it is of particular note that two recently developed high affinity chimeric and humanised anti-FcγRIIB monoclonal antibodies (ch2B6 or hu2B6-3.5, respectively) are capable of directing cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells and monocyte-derived macrophages against B-lymphoma lines *in vitro* and anti-tumour activity *in vivo*. Both the *in vitro* and *in vivo* activities of these antibodies required an intact Fc, suggesting an FcR-mediated mechanism of action. Interestingly, however, these antibodies did not display direct apoptotic activity on tumour B cells *in vitro*(21). Our data provide novel evidence that selective and direct tumour cell killing by mechanisms that involve FcγRIIB phosphorylation, caspase activation and / or AIF release to the cytosol is a property of at least some anti-FcγRII antibodies. Future antibody engineering might aim to exploit this novel cell death pathway for therapeutic purposes(22).

Acknowledgements

We acknowledge the Fondation de France, the Région Rhone-Alpes programme 'thématique prioritaire - Cancer', and the canceropôle CLARA for financial support. Juliana Ribeyron was the recipient of doctoral fellowships from the ARAMIS association, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Société Française d'Hématologie; Alexandra Fournier of doctoral funding from the Ministère de l'Education; Anne Florin of post-doctoral funding from the ARECA network "epigenetic profiling in breast and haematological tumours"; Mary Callanan of a "Contrat d'Interface INSERM / Grenoble University Hospital Centre. We are grateful to Dr Saadi Khochbin for stimulating discussions and helpful suggestions on the work. We thank professors JJ Sotto and JY Cahn (Dept. Oncology and Hematology, CHU de Grenoble, France) for their help and encouragement throughout the study.

Bibliography

1. Ravetch, J. V. & Lanier, L. L. (2000) *Science* 290, 84-9.
2. Pearce, R. N., Kawabe, T., Bolland, S., Guinamard, R., Kurosaki, T. & Ravetch, J. V. (1999) *Immunity* 10, 753-60.
3. Ashman, R. F., Peckham, D. & Stunz, L. L. (1996) *J Immunol* 157, 5-11.
4. Tzeng, S. J., Bolland, S., Inabe, K., Kurosaki, T. & Pierce, S. K. (2005) *J Biol Chem* 280, 35247-54.
5. Fukuyama, H., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2005) *Nat Immunol* 6, 99-106.
6. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2006) *Immunity* 24, 19-28.
7. Callanan, M. B., Le Baccon, P., Mossuz, P., Duley, S., Bastard, C., Hamoudi, R., Dyer, M. J., Klobeck, G., Rimokh, R., Sotto, J. J. & Leroux, D. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 309-14.

8. Chen, W., Palanisamy, N., Schmidt, H., Teruya-Feldstein, J., Jhanwar, S. C., Zelenetz, A. D., Houldsworth, J. & Chaganti, R. S. (2001) *Oncogene* 20, 7686-93.
9. Greer, W. L., Lee, C. L., Callanan, M. B., Zayed, E. & Sadek, I. (2003) *Am J Hematol* 74, 112-8.
10. Camilleri-Broet, S., Cassard, L., Broet, P., Delmer, A., Le Touneau, A., Diebold, J., Fridman, W. H., Molina, T. J. & Sautes-Fridman, C. (2004) *Br J Haematol* 124, 55-62.
11. Lajmanovich, A., Irisarri, M., Molens, J. P., Pasquier, M. A., Sotto, J. J., Bensa, J. C., Leroux, D. & Plumas, J. (2004) *Br J Haematol* 124, 746-53.
12. Lajmanovich, A., Irisarri, M., Jacob, M. C., Plumas, J., Roucard, C. & Sotto, J. J. (1998) in *American Society of Hematology*, Miami, USA).
13. Ierino, F. L., Hulett, M. D., McKenzie, I. F. & Hogarth, P. M. (1993) *J Immunol* 150, 1794-803.
14. Irisarri, M., Plumas, J., Bonnefoix, T., Jacob, M. C., Roucard, C., Pasquier, M. C., Sotto, J. J. & Lajmanovich, A. (2000) *Leukemia* 14, 2149-2158.
15. Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T. & Ravetch, J. V. (1997) *Cell* 90, 293-301.
16. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. & Kroemer, G. (2006) *Cell Death Differ* 13, 1423-33.
17. Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E. & Garrido, C. (2000) *Nat Cell Biol* 2, 645-52.
18. Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C. & Kroemer, G. (2000) *J Exp Med* 192, 571-80.
19. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R.,

Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer, G. (1999) *Nature* 397, 441-6.

20. Michaeli, D. (2005) *Semin Oncol* 32, S82-6.

21. Rankin, C. T., Veri, M. C., Gorlatov, S., Tuailon, N., Burke, S., Huang, L., Inzunza, D., Li, H., Thomas, S., Johnson, S., Stavenhagen, J., Koenig, S. & Bonvini, E. (2006) *Blood*.

22. Teillaud, J. L. (2005) *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, S15-27.

Titles and legends to figures

Figure 1. Flow cytometric analysis of FcγRII expression in normal and tumoral B lymphocytes. Expression was evaluated with FLI 8.26 antibody and indirect labelling using GAM FITC-conjugated goat (filled area) isotype-matched Ab (dashed line) and saturating concentrations of GAM FITC-conjugated (solid line). The figure shows FcγRIIB expression on lymphoma B cells and on normal B cells (spleen B cells).

Figure 2. Dose-dependent cell death induction by treatment with the anti-FcγRIIA/B antibody, FLI 8.26, in lymphoma cells. (A) Percent cell death as assessed by flow cytometric analysis of propidium iodide/ annexin V double staining in B593 cells incubated with increasing doses of FLI 8.26 (0.5–10µg/ml) for 0.5 to 48h. Values are means (±S.D.) of three independent experiments. (B) Representative flow cytometry dot blots for propidium iodide/ annexin V double staining in B593 cells treated with 1ug/ml or 10ug/ml of FLI 8.26 or control isotype antibody (10µg / ml) for 4, 24 and 48h. (C) Flow cytometric assessment of cell death by PI / annexin V double staining in normal and tumour B cells (Daudi, BL41) treated with FLI 8.26 (10µg/ml for 48h).

Figure 3. FcγRII-mediated cell death proceeds via both caspase-independent and caspase-dependent pathways. (A) B593 and BL41 cells were incubated with FLI 8.26 antibodies, in the absence (open bars) or presence (closed bars) of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk. Cell death was assessed by measuring PI/Annexin V double staining using flow cytometry. Pan-caspase inhibitor offers partial protection to FLI 8.26-induced cell death in both B593 and BL41 cells (cell death reduced from 90 to 50% and 70 to 15%, respectively). Values are means (±S.D.) of three independent experiments. Isotype control IgG is represented by "C". Induction of FAS-dependent apoptosis in the presence or absence of z-VAD-fmk was used as a control for inhibition of caspase activity in B593 cells. (B) B593 or (C) BL41 cells were treated with FLI 8.26

antibody at 1µg/ml ml (B593 cells) or 10µg / ml (BL41 and B593 cells) in the absence or presence of the pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk (100µM). Caspase and PARP1 cleavage were assessed by western blotting in whole cell extracts using antibodies recognising procaspase 8, 3 and 9 anti-caspase or PARP as indicated. Actin was used to control for equal loading. Isotype control IgG is represented by "C". Numbers indicate the percentage of apoptotic cells.

Figure 4. Nuclear morphology and internucleosomal DNA fragmentation in FcγRII-mediated cell death. DAPI staining of B593 cells (A) and BL41 cells (B) following treatment with FLI 8.26 antibody at 1 (B593 cells) or 10µg/ml (BL41 and B593 cells) in the absence (top panels) or presence (lower panels) of the pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk (100µM). Results are representative of 3 individual experiments. Original magnification, x1000. (C) Internucleosomal DNA fragmentation assay in B593 cells treated with 1µg/ml or 10µg/ml FLI 8.26 for either 24 or 48h. Chromatin prepared from B593 cells undergoing FAS-induced apoptosis was included as a positive control for internucleosomal DNA fragmentation.

Figure 5. Investigation of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cytosolic release of cytochrome c and AIF in B593 cells undergoing FLI 8.26-induced cell death. (A) Flow cytometric assessment of ($\Delta\Psi_m$) using DiOC6 vital staining in B593 cells treated with FLI 8.26 antibody at 1 or 10µg ml in the absence (top panel) or presence (bottom panel) of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (100µM z-VAD-fmk) from a single representative experiment. (B) Histograms giving mean values (\pm S.D.) for ($\Delta\Psi_m$) in three independent experiments in B593 cells tested under identical conditions (open bars in the absence of z-VAD-fmk ; closed bars indicate presence of z-VAD-fmk). (C) Cell fractionation and western blotting assessment of cytochrome c and AIF

cytosolic release in B593 cells treated for 24h with FLI 8.26 antibody (1 or 10µg / ml). Immunoblotting was performed on cytosolic fractions using antibodies recognizing cyt c and AIF. Actin was used to check for equal gel loading. Absence of COX4 from cytosolic fractions indicates absences of mitochondrial contamination.

Figure 6. Engagement of FcγRII by FLI 8.26 results in modulation of HSP27 expression levels in B593 and BL41 cells. Cells were treated with FLI 8.26 antibody at 1 or 10µg/ml for varying incubations as indicated. Assessment by western blotting of HSP27, 70 and 90 expression in whole cell extracts of B593 cells (A) or BL41 cells (B). Actin was used to check for equal gel loading. Control extracts from B593 or BL41 cells treated with Isotype control IgG is indicated as “C”.

Figure 7. FcγRIIB phosphorylation in FcγRII-mediated cell death. B593 cells were treated with 1 µg/ml FLI8.26 or isotype control IgG for 1, 5 and 30 minutes. FcγRII receptors were immunoprecipitated and eluates were sequentially immunoblotted with antibodies recognising phosphotyrosine and the intracellular domain of FcγRIIB. The presence of two bands in anti-FcγRIIB immunoblots for B593 cells reflects expression of two distinct isoforms of FcγRIIB (FcγRIIb1 and FcγRIIb2). Phosphorylation of both FcγRIIB isoforms is visible as early as 5 minutes post FLI 8.26 stimulation. Phosphorylation is specific as it is not observed in extracts derived from isotype control treated B593 cells. Results are representative of 3 individual experiments.

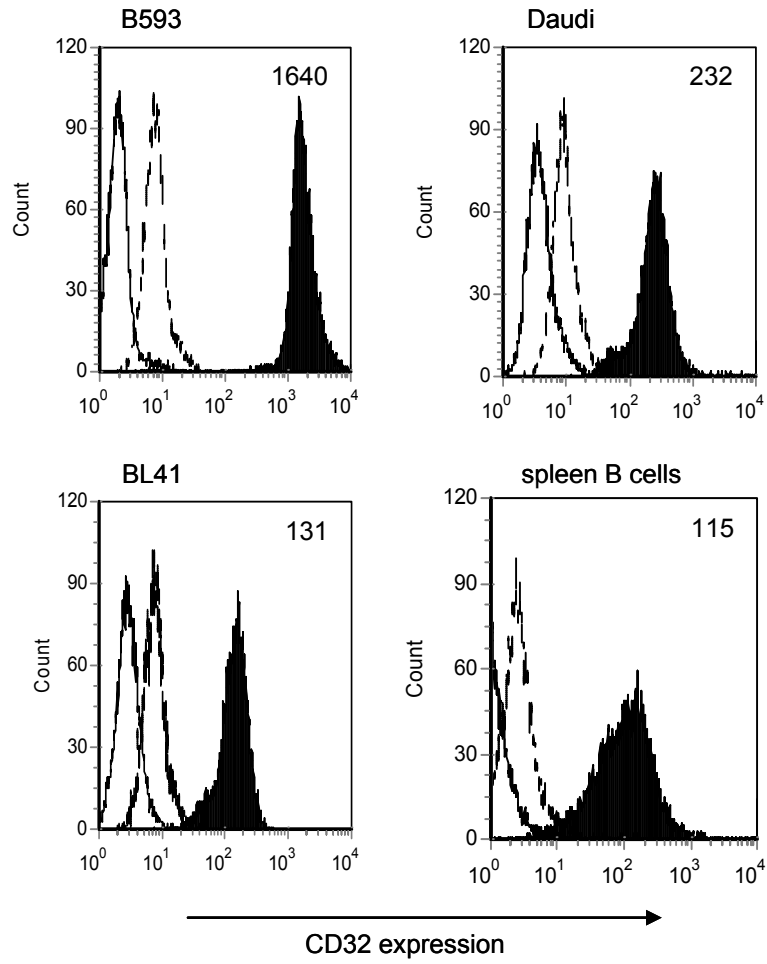


Figure 1

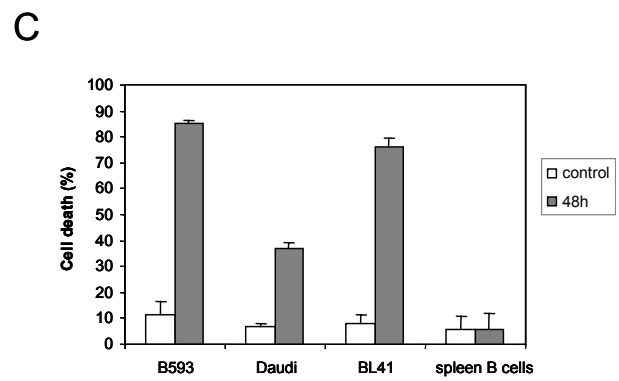
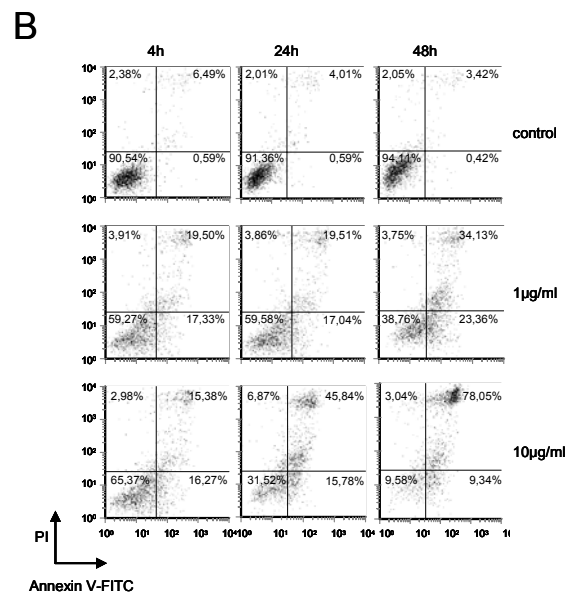
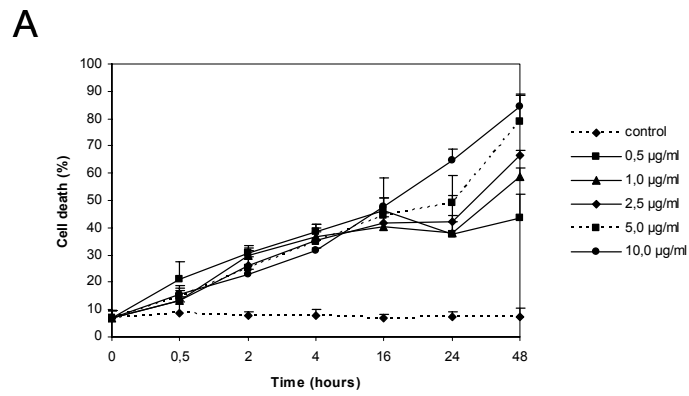


Figure 2

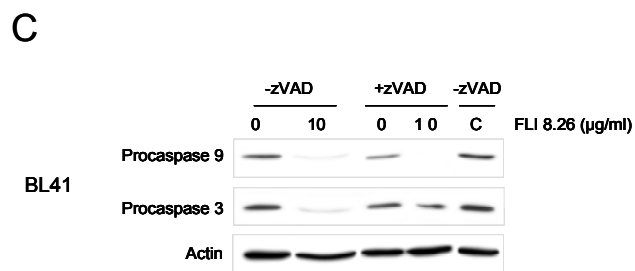
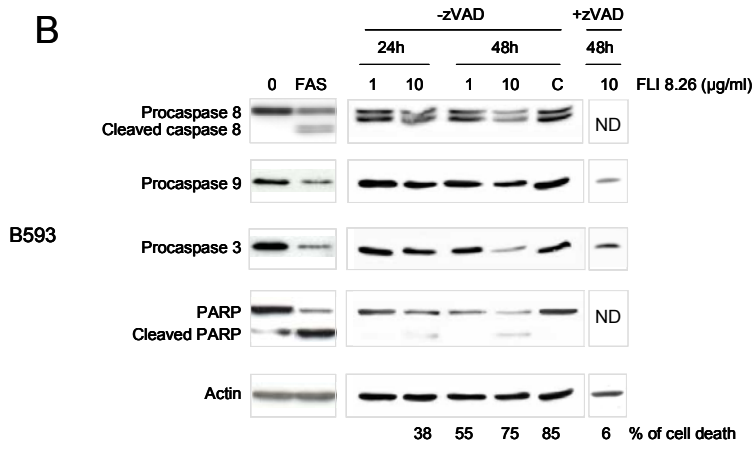
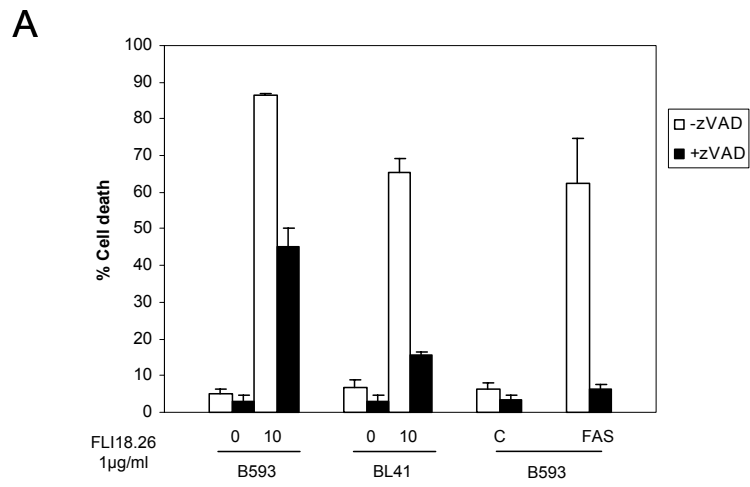


Figure 3

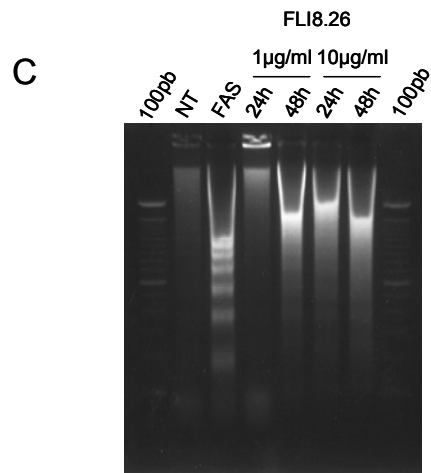
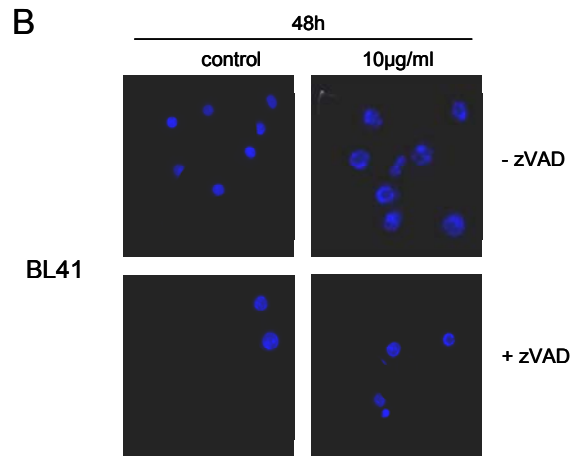
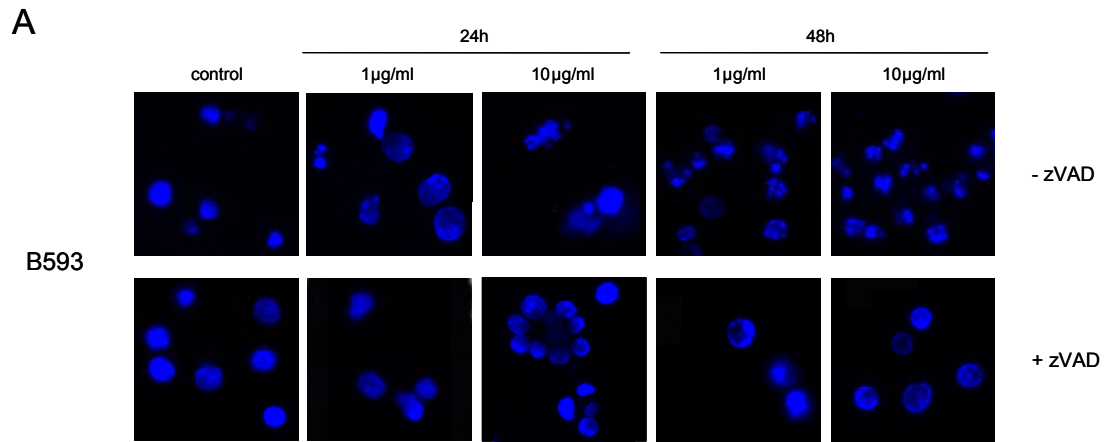
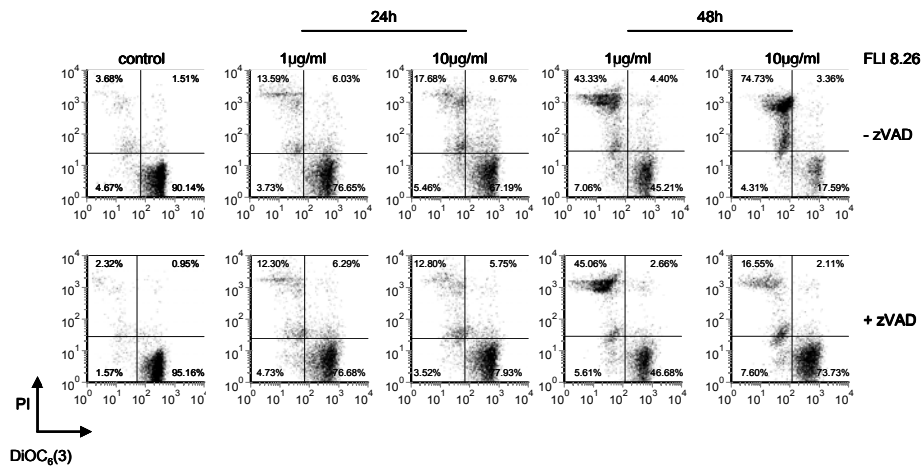
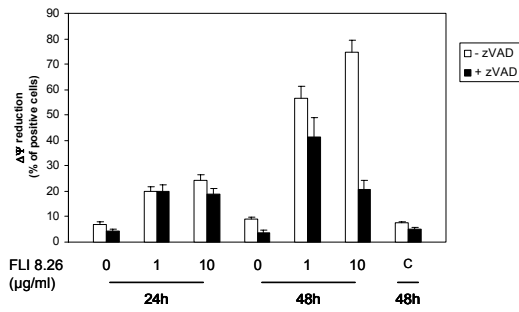


Figure 4

A



B



C

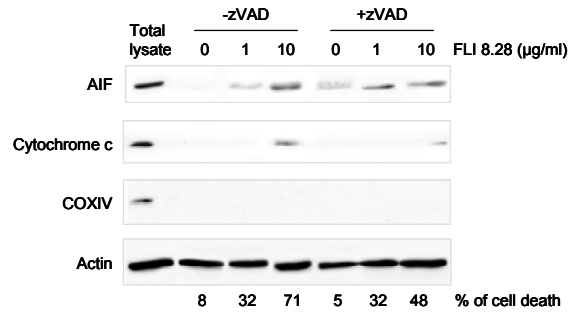


Figure 5

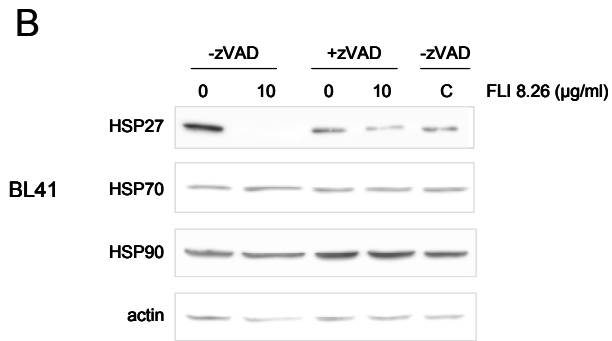
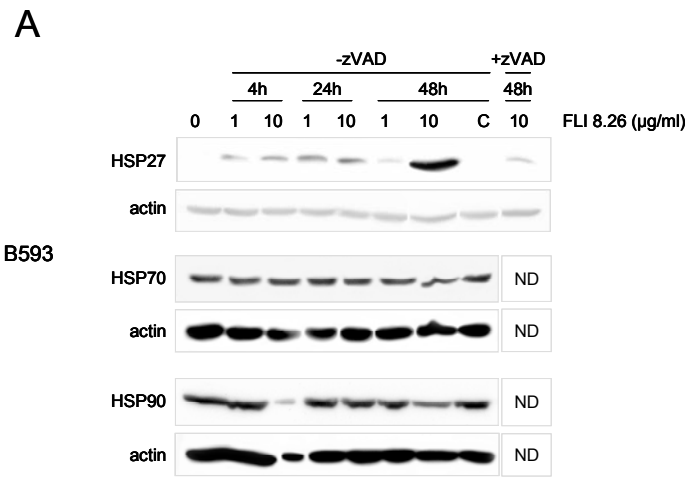


Figure 6

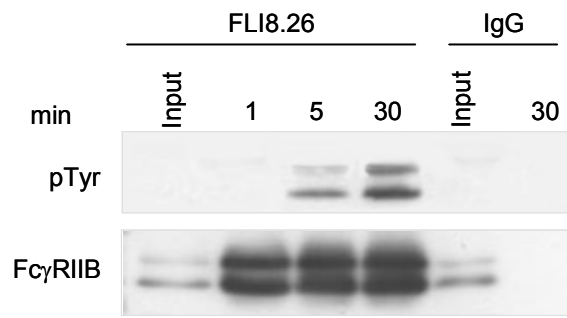


Figure 7

II. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Les résultats obtenus lors de la première partie de ce travail ont montré que l'homoagrégation du récepteur Fc γ RIIB, dans les cellules des lymphomes humains, induit un programme de mort cellulaire. Dans le modèle cellulaire utilisée (lignée B593) nous montrons que la fonction pro-apoptotique du récepteur (ITIM-indépendante) n'est pas perturbée par la surexpression de Fc γ RIIB (t(1 ;22)). Etant donné l'importance du récepteur Fc γ RIIB dans le contrôle de l'activation et de la prolifération cellulaire B, nous avons voulu vérifier, également, l'impact de sa surexpression sur ses fonctions inhibitrices (ITIM-dépendante) lors de son engagement avec le BCR.

1. Etude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593

1.1. Expression membranaire des récepteurs Fc γ RIIB et BCR.

Nous avons montré la surexpression de *FCGR2B* dans la lignée B593, comparativement à d'autres lignées cellulaires (Callanan et al, 2000). L'analyse par western blot, des lignées cellulaires (lymphomes B et leucémies), révèle la présence de deux bandes fortement exprimées de 35 et 40kD qui correspondent probablement aux isoformes du récepteur, Fc γ RIIb1 et Fc γ RIIb2 (Figure 38A). Comme attendu les lignées cellulaires lymphocytaires B expriment Fc γ RIIb1 à différents niveaux d'expression, alors que les lignées lymphocytaires T (Jurkat) et myéloïde (U937 et HL60) n'expriment pas Fc γ RIIB.

Pour étudier les réponses négatives du récepteur Fc γ RIIB sur les voies activatrices dépendante du BCR nous avons, tout d'abord, étudié l'expression membranaire du récepteur BCR dans la lignée B593. Nous avons analysé l'expression membranaire des récepteurs BCR et Fc γ RIIB dans la lignée tumorale B Daudi, ne présentant pas de dérégulation au niveau du gène *FCGR2B*, comme contrôle normal d'expression du récepteur Fc γ RIIB. L'analyse de l'expression membranaire des récepteurs a été réalisée par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps anti-CD32, qui reconnaît Fc γ RIIB et d'un anticorps qui reconnaît la partie extracellulaire de la protéine CD79b du BCR. Les deux anticorps sont marqués à la phycoérythrine. La figure 38B illustre l'expression membranaire des récepteurs dans la lignée B593 et dans la lignée Daudi. L'analyse par cytométrie en flux montre une expression modérée de Fc γ RIIB, avec une moyenne de fluorescence (MFI) de 58 dans la lignée Daudi comparée à la surexpression dans la lignée B593 (MFI de 780). L'expression du BCR dans la lignée Daudi est comparable à celle de la lignée B593. Les résultats montrent des MFI de 535 et 538 pour Daudi et B593, respectivement. Ces résultats révèlent que les deux lignées expriment de façon comparable le récepteur BCR, alors que Fc γ RIIB est surexprimé dans la lignée B593 comparé à la lignée Daudi.

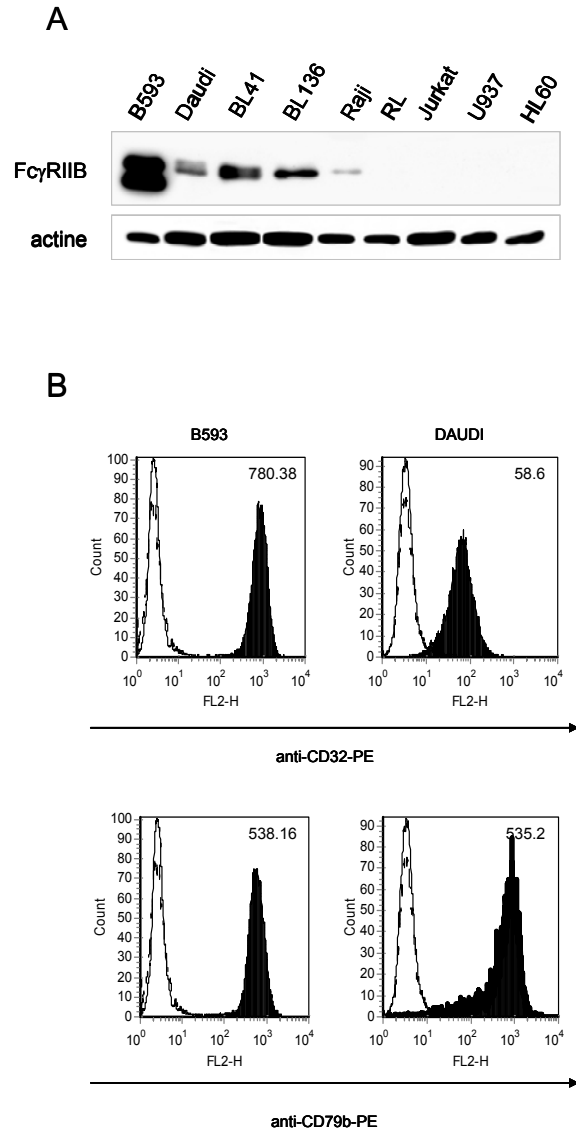


Figure 38: Analyse de l'expression de Fc γ RIIB dans des lignées de lymphomes B humains.

Immunodétection de Fc γ RIIB sur des lysats cellulaires totaux dans B593 (LM Folliculaire), Daudi (LM de Burkitt), BL41 (LM de Burkitt), BL136 (LM de Burkitt), Raji (LM de Burkitt), RL (LM folliculaire), Jurkat (LLT), U937 (LAM) et HL60 (LAP). Les protéines (15 μ g) ont été séparées par SDS-PAGE puis immuno-détectées à l'aide d'un anticorps de lapin anti Fc γ RIIB (anti-domaine intracellulaire) (A). Analyse par cytométrie en flux de l'expression de Fc γ RIIB et du BCR (CD79b) dans B593 et Daudi. La courbe en trait continu indique l'auto fluorescence cellulaire, la courbe en trait discontinu indique la fixation non spécifique d'une IgG2b-PE de souris et la courbe pleine en noir représente la fluorescence après incubation avec l'anticorps anti CD32-PE ou CD79b. Les histogrammes représentent l'analyse de 10000 évènements (B).

1.2. Etude de l'état de la phosphorylation des protéines totales et de l'état d'activation de voies BCR-dépendantes

Afin de déterminer l'impact de la surexpression constitutive de Fc γ RIIB sur ses fonctions inhibitrices dans la lignée B593, nous avons effectué des expériences de recrutement du BCR seul et de co-recrutement du BCR avec Fc γ RIIB. Dans nos expériences le recrutement des récepteurs BCR seuls a été effectué à l'aide de l'anticorps fragment F(ab')₂ d'IgG de chèvre anti-IgG + IgM humaines pour éviter le co-recrutement des récepteurs Fc. Le co-recrutement des récepteurs BCR et Fc γ RIIB a été réalisé à l'aide de l'anticorps intact de souris (IgG2b) anti-IgM humaine. Nous avons évalué par western blot le niveau global de tyrosines phosphorylées sur les résidus tyrosines suite à l'engagement du BCR seul et après co-engagement avec Fc γ RIIB, ainsi que l'état d'activation de voies BCR-dépendantes.

Dans la figure 39A nous pouvons observer que la lignée B593 à l'état non stimulé présente un niveau faible de phosphorylation (piste 1). Comme attendu, l'engagement du BCR seul induit une augmentation du taux de phosphorylation de nombreuses protéines, observés dès 5 minutes d'engagement (pistes 2-4). Suite au co-recrutement du BCR avec Fc γ RIIB nous constatons une diminution importante du niveau global de phosphorylation (pistes 5-7). Ce profil de phosphorylation est semblable à celui dans la lignée B593 sans induction (piste 1). Des résultats similaires sont identifiés dans la lignée Daudi (Figure 39B). Cependant, le potentiel d'inhibition de Fc γ RIIB dans la lignée B593 est supérieur à celui dans la lignée Daudi. L'inhibition est maintenue jusqu'à 30 minutes dans B593 alors que dans la lignée Daudi elle est maximale à 5 minutes. Ceci peut être expliqué par la différence du niveau du taux d'expression de Fc γ RIIB dans les deux lignées. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Cooper montrant l'inhibition de voies activatrices par Fc γ RIIB dans un modèle murin (Ehrhardt et al., 2003) et indiquent fortement que le récepteur Fc γ RIIB est capable d'inhiber les voies activatrices BCR dépendantes dans les lignées B593 et Daudi.

Nous avons ensuite évalué également par western blot le niveau d'activation de la voie PI3K/Akt, ainsi que de la voie MAP Kinase (BCR-dépendante).

La protéine Akt est une cible d'activation importante de la voie PI3K. La protéine Akt peut favoriser le développement de tumeurs par sa fonction anti-apoptotique. Nous avons donc étudié l'état de phosphorylation d'Akt à l'aide d'anticorps dirigés contre Akt phosphorylée sur les résidus Ser473, dans B593. Comme montré dans la figure 39C, la protéine Akt est phosphorylée

constitutivement (sans induction) dans la lignée B593 (piste 1). L'engagement du BCR augmente légèrement sa phosphorylation (pistes 2-3). Le co-recrutement avec le récepteur Fc γ RIIB rétablit le profil de phosphorylation initial (pistes 4-6).

L'activation de la voie MAPK kinase est nécessaire pour la prolifération des lymphocytes B. Nous avons analysé par western blot l'état de phosphorylation de la protéine ERK, à l'aide d'anticorps dirigé contre ERK1/2 phosphorylée sur les résidus Thr202/Tyr204. Nous pouvons observer, dans la figure 39D, que contrairement à la protéine Akt, ERK1/2 n'est pas phosphorylée dans la lignée B593 à l'état non stimulé (piste 1). L'engagement du BCR seul induit une augmentation de sa phosphorylation (pistes 2-4). Suite au co-recrutement du BCR avec Fc γ RIIB nous observons une inhibition totale de la phosphorylation (pistes 5-7). Ces résultats confirment les résultats précédents obtenus sur l'analyse globale des phosphorylations de protéines. Ils sont en accord avec ceux d'Isnardi et al montrant l'inhibition de l'activation des protéines Akt et ERK suite au co-recrutement des récepteurs BCR et Fc γ RIIB. A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que le récepteur Fc γ RIIB est capable d'inhiber les voies activatrices BCR dépendante, dans les lignées B593, au moins dans les conditions expérimentales utilisées.

Ces résultats suggèrent fortement que les fonctions inhibitrices du récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593 ne sont pas perturbées par sa surexpression constitutive, au moins dans les conditions expérimentales utilisées.

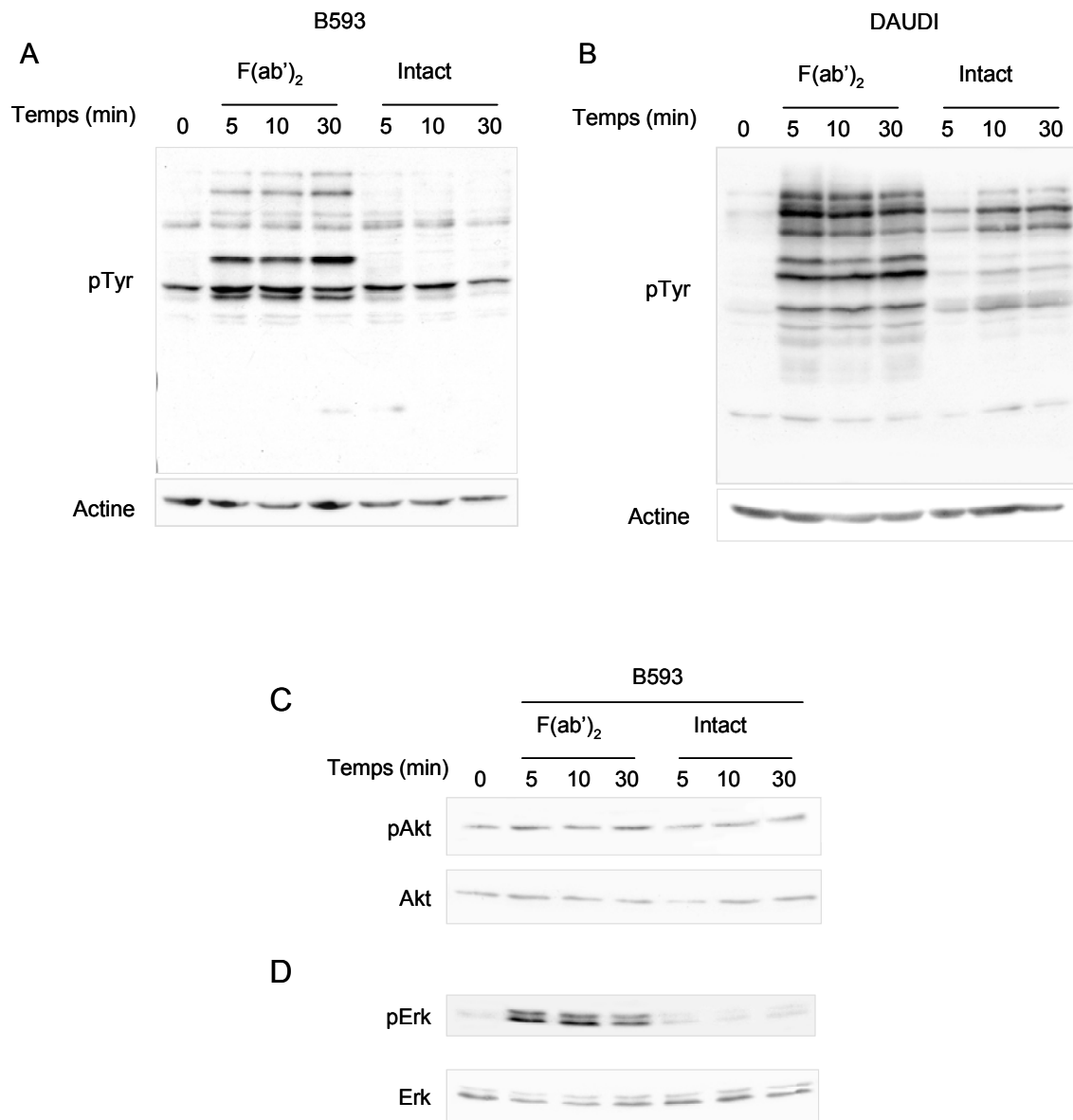


Figure 39: Co-engagement du récepteur Fc γ RIIB et BCR dans les lignées B593 et Daudi. Les lignées B593 et Daudi sont stimulées avec le fragment F(ab')₂ d'IgG de chèvre anti-IgG + IgM humaine ou avec l'anticorps de souris (IgG2b) anti-IgM humaine. Les protéines (40 μ g) ont été séparées par SDS-PAGE puis immuno-détectées à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine (A, B) et à l'aide d'un anticorps anti-pAKT, anti-AKT (C), anti-pErk et anti-Erk (D).

1.3. Etude de l'état de phosphorylation de Fc γ RIIB après recrutement avec le BCR

Les données existantes dans la littérature révèlent la phosphorylation de Fc γ RIIB murin suite à son recrutement avec le BCR. Récemment l'équipe de Daëron a montré la phosphorylation de Fc γ RIIB humain transfecté dans des cellules murines, ainsi qu'après transfection dans une lignée de lymphome B humain. Cependant, Fc γ RIIB humain qui possède deux résidus tyrosines, dans la partie intra cytoplasmique, est très peu phosphorylé comparé au récepteur murin avec quatre résidus tyrosine.

Dans ce contexte, nous avons réalisé des expériences visant à déterminer l'état de phosphorylation de Fc γ RIIB suite à son engagement avec le BCR. Nos n'avons pas pu mettre en évidence la phosphorylation de Fc γ RIIB après recrutement avec le BCR. Vues les difficultés techniques que nous avons rencontrées, au cours de ces expériences, nos résultats ne sont pas significatifs. Cependant, l'ensemble des résultats sur l'étude de la signalisation négative du récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593, nous a permis de conclure que le récepteur Fc γ RIIB est capable d'inhiber les voies activatrices BCR dépendante dans la lignée B593 suite à son co-recrutement avec le BCR.

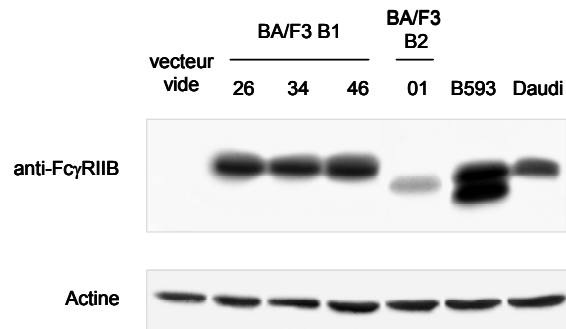
2. Modèles cellulaires exprimant les isoformes de Fc γ RIIB – Lignée BA/F3

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique de ce travail, la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante est très peu étudiée. Son étude est limitée à l'isoforme Fc γ RIIb1 murine. Ainsi, il nous a semblé intéressant de développer un modèle d'étude afin de discerner les rôles respectifs des isoformes de Fc γ RIIB humain dans l'induction de la mort cellulaire de la lignée B593. Pour cela nous avons établi 4 clones stables à partir de la lignée BA/F3 : trois clones expriment l'isoforme Fc γ RIIb1, et un clone l'isoforme Fc γ RIIb2. (voir matériel et méthodes).

2.1. Analyse de l'expression du récepteur Fc γ RIIB dans les clones

Nous avons transfecté les cellules BA/F3 (lignée pro-lymphocytaire B, IL3-dépendante) avec un vecteur codant pour les protéines Fc γ RIIb1 ou Fc γ RIIb2, ainsi que le vecteur vide. Les clones ont été établis par la technique de dilution limite et ont été analysés par western blot ainsi que par cytométrie en flux, quant à l'expression du récepteur Fc γ RIIB. Dans la figure 40A, l'analyse par western blot révèle comme attendu l'absence du récepteur au niveau du clone transfecté avec le vecteur vide. Elle révèle aussi la présence de b1 sur trois clones (pistes 2-4) et la présence de b2 (piste 5) sur un clone. L'écart observé au niveau de b1 et b2 entre les clones et la lignée B593 (piste 6) est expliqué par la présence de l'épitope HA dans le vecteur. L'analyse par cytométrie en flux confirme ces résultats. Le clone 46 exprime l'isoforme b1 et le clone 01, à un niveau moins élevé, exprime b2. Nous observons, dans la figure 40B, l'absence de Fc γ RIIB au niveau de la lignée BAF/3.

A



B

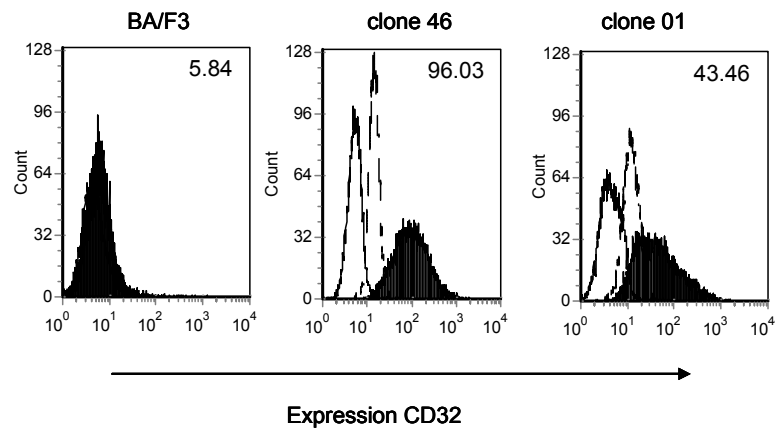


Figure 40: Expression du récepteur Fc γ RIIB dans les clones. Analyse par western blot de l'expression de récepteurs Fc γ RIIB dans les clones établis à partir de la lignée BA/F3. Trois clones expriment l'isoforme b1 et un clone exprime l'isoforme b2. Les protéines (15 μ g) ont été séparées par SDS-PAGE ensuite immuno-détectées à l'aide de l'anticorps de lapin anti-Fc γ RIIB (anti-domaine intracellulaire) (A). Analyse de l'expression membranaire de Fc γ RIIB1 et b2 par cytométrie en flux dans la lignée BA/F3, le clone 46 (b1) et clone 01 (b2). Les histogrammes représentent l'analyse de 10 000 événements. (B)

2.2. Etude des réponses cellulaires au cours du recrutement du récepteur Fc γ RIIB

Nous avons évalué la réponse apoptotique induite par les deux isoformes individuellement. Les lignées ont été stimulées à l'aide de l'anticorps anti-Fc γ RII (FLI 8.26) à la concentration de 10 μ g/ml pendant 48h. Un anticorps de même isotype a été utilisé comme contrôle. L'engagement de Fc γ RIIb1 dans les cellules du clone 46 induit environ 35% de mort cellulaire à 48 heures, démontré par une augmentation du pourcentage de cellules annexine V positives (Figure 41). Cependant, cette mort cellulaire n'est pas sensible au traitement par le z-VAD-fmk (100 μ M). Comme attendu la lignée parentale BA/F3 n'est pas sensible à l'homo-agrégation des récepteurs Fc γ RIIB ainsi que le clone 01 exprimant l'isoforme b2. La mort des cellules du clone 46 est caractérisée par une cinétique lente par rapport à la cinétique d'induction de l'apoptose par le récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593 (laquelle montre 85% de mort à 48 heures- cf Figure 2 Article). Cet écart au niveau de la cinétique de mort entre le clone 46(b1) et la lignée B593 pourrait être lié à la différence d'expression du récepteur Fc γ RIIB, dans ces deux lignées. En effet, le clone 46 exprime l'isoforme b1 à un taux modéré (MFI de 96) (Figure 40B) alors que la lignée B593 exprime à un taux très élevé (MFI de 780) (Figure 38). Ce travail indique le rôle exclusif de Fc γ RIIb1 dans l'induction de la mort cellulaire en accord avec la littérature (Pearse et al., 1999, Tzeng et al., 2005)

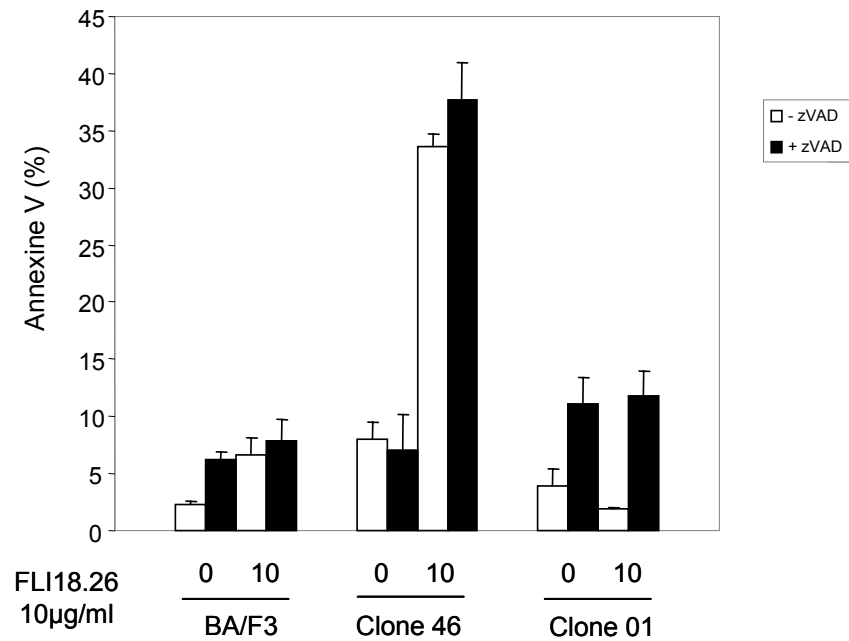


Figure 41: Evaluation par cytométrie de flux de la mort cellulaire $Fc\gamma RIIB$ dépendante dans les clones 46(b1) et 01(b2). Les histogrammes représentent la moyenne (n=3) du pourcentage de fixation spécifique de l'annexine V sur les clones 46 et 01 comparées à la lignée BA/F3 wt, après 48h de culture en présence de 10µg/ml de l'anticorps FLI 8.26 seul en absence et en présence de inhibiteur global de caspases, le z-VAD-fmk.

DISCUSSION

Des altérations au niveau de l'homéostasie des cellules B, comme l'augmentation de la prolifération ou la diminution de la mort cellulaire sont à l'origine du développement clonal des cellules B. Le récepteur Fc γ RIIB est décrit comme un régulateur notable de l'activation et de l'expansion cellulaire B. Il est membre fondateur d'une famille de récepteurs inhibiteurs caractérisés par la présence d'un motif ITIM (Ravetch and Lanier, 2000). Ces récepteurs à motif ITIM jouent un rôle clé dans la régulation négative de processus d'activation cellulaires induits par des récepteurs à motif ITAM, tels que le récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR). Le récepteur Fc γ RIIB peut également réguler les fonctions lymphocytaires B par des voies indépendantes du motif ITIM. Ainsi, l'homo-agrégation du récepteur induit une réponse apoptotique essentiellement décrite chez la souris (Ono et al., 1996; Pearse et al., 1999, Tzeng et al., 2005). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont que peu étudiés à l'heure actuelle. Cependant cette voie de régulation est supposée jouer un rôle important dans l'élimination de lymphocytes B montrant une faible affinité pour l'antigène.

Plus précisément, notre équipe a été la première à montrer que la translocation du gène *FCGR2B* à proximité de l'enhancer des gènes d'immunoglobulines lambda (IGL), observée au cours d'une translocation t(1;22) récurrente dans les lymphomes folliculaires, entraînait la dérégulation de l'expression du récepteur Fc γ RIIB (Callanan et al., 2000). Ces résultats suggèrent que le déséquilibre des fonctions régulatrices de Fc γ RIIB (secondaire à une translocation chromosomique) serait susceptible de jouer un rôle dans la pathogenèse des lymphomes folliculaires. Des études déjà anciennes ont montré le rôle oncogénique de la surexpression des isoformes Fc γ RIIb1 et b2 dans des lignées tumorales non lymphoïdes (3T3) (Zusman et al ; 1996). De plus, une étude de coopération oncogénique a montré que Fcgr2b est capable d'accélérer la leucémogénèse induite par le gène de fusion leucémique NUP98-HOXA9 (Iwasaki et al., 2005). Enfin, une étude en immunohistochimie a montré l'expression de Fc γ RIIB dans 54% de lymphomes B non-Hodgkiniens (Camilleri-Bröet et a., 2004).

Dans ce contexte, étant donné l'importance du récepteur Fc γ RIIB dans le contrôle de l'activation et de la prolifération cellulaire B, nous avons évalué l'impact de la surexpression du récepteur Fc γ RIIB sur la signalisation lors de son co-recrutement avec le récepteur à l'antigène du

lymphocyte B, le BCR, ainsi que lors de l'homoagrégation des récepteurs seuls en s'appuyant sur un modèle cellulaire unique – la lignée B593.

La signalisation du récepteur Fc γ RIIB, point de contrôle important dans la régulation de la prolifération des lymphocytes B est très fortement documentée dans la littérature. Le point essentiel de cette signalisation lorsque le récepteur Fc γ RIIB est co-engagé avec le BCR, est la phosphorylation du motif ITIM sur les résidus tyrosine. Cette phosphorylation permet ainsi le recrutement de phosphatases comme la phosphatase SHIP qui initie une cascade de signalisation conduisant à l'inhibition de voies d'activation BCR dépendante, entraînant ainsi l'arrêt de la prolifération du lymphocyte B.

Dans différents modèles cellulaires, le potentiel inhibiteur du récepteur Fc γ RIIB est révélé par sa capacité à inhiber les phosphorylations des résidus tyrosine ainsi que plus spécifiquement la voie AKT et la voie MAPKinase. Ainsi, nous avons étudié la capacité du récepteur Fc γ RIIB à inhiber la phosphorylation globale des résidus tyrosine et l'activation de voies AKT et ERK lors du co-recrutement de Fc γ RIIB et BCR. Nous montrons que la capacité du récepteur Fc γ RIIB à inhiber la voie MAPkinase a été plus efficace que sa capacité à inhiber l'activation d'AKT. Ceci peut être expliqué par le fait que la protéine AKT est phosphorylée à l'état non stimulé dans la lignée B593. Il est ainsi démontré dans notre modèle que le récepteur Fc γ RIIB est capable d'inhiber les voies activatrices BCR dépendante, cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence de façon reproductible la phosphorylation de Fc γ RIIB. Nous concluons cependant que la surexpression du récepteur Fc γ RIIB dans la lignée B593 ne perturbe pas ses fonctions inhibitrices.

Nous avons ensuite, dans un premier temps, abordé les conséquences du recrutement des récepteurs Fc γ RIIB seuls dans la lignée B593, comparées à d'autres lignées tumorales B, exprimant des niveaux différents de Fc γ RIIB.

Pour étudier les conséquences du recrutement des récepteurs Fc γ RIIB seuls nous avons utilisé trois lignées de lymphome B et des lymphocytes B spléniques humains normaux. En plus de la lignée B593, nous avons utilisé les lignées Daudi et BL41, lignées de lymphome de Burkitt avec un taux modéré d'expression de Fc γ RIIB. Nous montrons que le co-recrutement de récepteurs Fc γ RII à l'aide d'anticorps anti-Fc γ RII (FLI 8.26) induit la mort cellulaire de cellules de lymphome

B et de façon intéressante, n'induit pas la mort des lymphocytes B normaux. Ceci suggère une caractéristique particulière des cellules tumorales.

En fonction du modèle cellulaire, nos résultats ont révélé que le traitement par l'anticorps FLI 8.26 induit un processus apoptotique dépendant et indépendant des caspases. Dans la lignée BL41 la mort cellulaire implique uniquement l'activation de la voie des caspases. La mort cellulaire dans la lignée B593 se produit par une voie dépendante des caspases et une voie indépendante. Nos résultats révèlent, pour la première fois, la mort cellulaire de lymphocytes B humains tumoraux induite par le récepteur Fc γ RII.

Notre modèle d'étude, la lignée B593, nous a permis de réaliser une caractérisation plus détaillée de la mort cellulaire induite par FLI 8.26, dans une condition de surexpression de Fc γ RIIB. La mort cellulaire dépendante de caspases est associée à la libération du cytochrome c, au clivage de la caspase-9, de la caspase-3, de la PARP, ainsi que la fragmentation de l'ADN oligonucleosomal, tout ceci observé avec les doses plus fortes à 48h. Nos résultats révèlent que le clivage de la caspase-9 est plus tardif (cinétique) comparé à la lignée BL41. De manière intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'activité de la caspase-9 n'a provoqué aucun blocage de la mort cellulaire induite par FLI 8.26, dans la lignée B593, alors qu'elle bloque partiellement la mort cellulaire dans la lignée BL41 (résultats non montrés). Ceci indique un défaut d'activation de la caspase-9 suggérant que ce processus de mort cellulaire, dans la lignée B593, serait indépendant de la formation de l'apoptosome, nécessaire pour de l'activation de la caspase-9. De plus, dans les deux lignées, le clivage de la procaspase-9 observé après traitement par FLI 8.26 n'est pas inhibé en présence de l'inhibiteur global de caspases. Ceci suggère que le clivage de la procaspase-9 et son activation (BL41) est indépendant de caspases.

Nos résultats ont révélé aussi le clivage (caspase dépendante) de la procaspase-3, dans la lignée B593. De plus, nous montrons que le substrat classique de la caspase-3, la PARP est clivée au cours de la mort cellulaire induite par FLI 8.26 dans la lignée B593. Classiquement, l'activation de la caspase-3 est réalisée par les caspases initiatrices. Elle peut être activée directement par la caspase-8, comme observé dans la voie extrinsèque de l'apoptose initiée par les récepteurs de mort. Nos résultats ont montré que la caspase-8 n'est pas clivée après traitement par FLI 8.26, dans la lignée B593. Ceci suggère que le mécanisme d'initiation de la mort cellulaire induite par Fc γ RII serait donc différent des mécanismes empruntés par les

récepteurs de morts. Des données récentes ont suggéré que l'activation de la caspase-3 est sous le contrôle de la caspase-4, mettant en jeu le réticulum endoplasmique (Pelletier et al., 2006) organelle cellulaire qui participe à l'apoptose induite par stress. Nous avons étudié cette hypothèse dans notre modèle, mais la lignée B593 n'exprime pas la procaspase-4 écartant ainsi la possibilité d'une interaction entre ces deux caspases. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activation de la caspase-3 est un point important de la voie caspase induite dans la lignée B593. Le mécanisme précis de cette activation reste à élucider.

D'une manière intéressante le traitement des cellules de la lignée B593 par FLI 8.26 induit l'expression de la protéine de choc thermique, HSP27. L'équipe de Garrido a montré que cette protéine chaperone est capable d'interagir directement avec l'apoptosome par association avec le cytochrome c, la caspase 9 ou encore Apaf-1 et d'empêcher l'activation de la caspase 9. Encore plus intéressant, le traitement par l'inhibiteur global de caspases, z-VAD-fmk, a induit une diminution très forte de l'expression de HSP27. Ces résultats suggèrent que l'induction de HSP27 est liée à l'activité caspase et ceci pourrait être un nouveau mécanisme de régulation négative de l'apoptose caspase dépendante en fonction du contexte cellulaire. En effet, nos résultats ont montré que le profil d'expression d'HSP27 dans la lignée B593 est différent de celui de la lignée BL41. Dans cette dernière, HSP27 est exprimé à l'état non stimulé et son expression est régulée négativement après traitement par l'anticorps FLI 8.26.

Nous avons mis en évidence une voie caspase indépendante empruntée par les cellules de la lignée B593, après traitement par l'anticorps FLI 8.26 à faibles doses à 24h. De plus, nos résultats ont montré la libération de la protéine AIF dans le cytosol. Cette libération est indépendante des caspases et est concomitante avec la perte du potentiel de la membrane mitochondriale. Ces données suggèrent fortement le rôle d'AIF dans ce processus. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gordon et al qui révèlent la libération d'AIF induite par la molécule MHC class I, en présence de l'inhibiteur de caspases (Gordon et al., 2003). Dans notre modèle, ce mécanisme a été observé dans les cellules alors qu'il n'y a aucune activation des caspases. De plus, les cellules de la lignée B593 où la protéine AIF est cytosolique ne montrent pas de condensation de la chromatine, ni la fragmentation de l'ADN à petite échelle. Ces caractéristiques nucléaires dans la lignée B593 s'accordent avec la description dans la littérature des phénomènes nucléaires induit par la protéine AIF (Susin et al., 2000). Il serait donc très pertinent de compléter ces résultats avec la détection de la protéine AIF nucléaire.

Comme mentionné ci-dessus, le seul processus apoptotique induit par le récepteur Fc γ RIIB décrit à l'heure actuelle concerne les travaux de Tzeng et al sur une lignée de lymphome B de poulet, transfectée avec le gène Fc γ RIIb1 murin. L'engagement des récepteurs Fc γ RIIb1, dans ce modèle, induit un processus apoptotique dépendant de caspases. Nos résultats révèlent que la mort cellulaire induite par Fc γ RIIB dans la lignée BL41 induit un processus essentiellement dépendant de caspases, tandis que dans la lignée B593 il se produit en présence et en absence d'activation de caspases. Ceci suggère une différence fonctionnelle entre les isoformes b1 de la lignée BL41 et de B593. Des études complémentaires par transfection de ces isoformes dans un vecteur cellulaire (lignée BA/F3) sont en cours et permettront de documenter cette hypothèse. De façon intéressante, des résultats préliminaires ont déjà montré que l'isoforme Fc γ RIIb1 dans ce modèle cellulaire murin (lignée BA/F3 ; clone 46) induit un processus indépendant de caspases.

Les travaux de Tzeng et al ont révélé également que la fonction pro-apoptotique du récepteur Fc γ RIIb1 murin est corrélée avec sa phosphorylation. Cette phosphorylation, observée en dehors du motif ITIM, est induite par les kinases de la famille Abl, c-Abl et Arg (Tzeng, et al., 2005). Dans ce modèle cellulaire, l'inhibiteur de l'activité kinase Abl, ST1751 (Imatinib) a inhibé la phosphorylation de Fc γ RIIb1 et a réduit le taux d'apoptose. Ainsi, nous avons étudié l'état de phosphorylation de Fc γ RIIB dans la lignée B593 après homoagrégation des récepteurs Fc γ RII (FLI 8.26). Nos résultats ont montré la phosphorylation de Fc γ RIIB comme un phénomène précoce au cours de la mort cellulaire FLI 8.26 induite dans la lignée B593. Il serait donc intéressant de réaliser des études complémentaires afin d'identifier les voies de signalisation impliquées dans ce processus, ainsi que d'évaluer l'implication du motif ITIM dans ce phénomène de phosphorylation. A l'heure actuelle, ce travail décrit, pour la première fois, la phosphorylation des récepteurs Fc γ RIIB dans un modèle cellulaire humain.

Ainsi, notre étude a montré que la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante n'est pas perturbée par la surexpression du récepteur Fc γ RIIB dans un cas de lymphome folliculaire. Le fait que le récepteur Fc γ RIIB aie des propriétés pro-apoptotiques fonctionnelles intactes fait de ce récepteur une perspective thérapeutique intéressante. D'autre part, des anticorps monoclonaux chimères et humanisés spécifiques de la région extracellulaire de Fc γ RIIB (CD32B), ch2B6 et hu2B6-3.5 capables d'induire la cytotoxicité cellulaire induite par anticorps (ADCC) contre les lignées tumorales B ont été développés. Ceci constitue un mécanisme additionnel de mort

cellulaire induite qui pourrait être mis à profit en thérapeutique. Dans un modèle de greffe xénogénique de lymphome B humain, l'administration de 2B6 entraîne la diminution de la croissance tumorale. Cette activité nécessite une région Fc intacte (Rankin et al., 2006). La stratégie de modification dirigée de l'anticorps est une approche qui permettra d'explorer d'avantage cette possibilité thérapeutique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La translocation t(1;22) identifiée dans les lymphomes folliculaires provoque la dérégulation du gène *FCGR2B*, et comme conséquence, la surexpression constitutive du récepteur Fc γ RIIB. Notre travail sur les conséquences de cette surexpression sur les fonctions régulatrices du récepteur Fc γ RIIB a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de mort cellulaire induite par l'anticorps FLI 8.26 dans une lignée de lymphome folliculaire. Ceci est un argument très favorable pour exploiter l'utilisation de ce récepteur comme une cible thérapeutique dans le traitement de lymphomes B.

Cependant, les mécanismes moléculaires régissant la pathogenèse des lymphomes restent encore à élucider. Pour cela, il a été nécessaire de développer d'autres approches expérimentales. Ainsi, nous avons développé un modèle cellulaire murin exprimant de manière stable les deux isoformes du récepteur, Fc γ RIIb1 et Fc γ RIIb2. Ce modèle permettra de transférer, en association à ces isoformes, des oncogènes divers dans le but de réaliser une étude de « coopération oncogénique ». Il serait particulièrement intéressant d'analyser la réponse aux formes mutantes du récepteur Fc γ RIIB pour identifier et caractériser le(s) domaine(s) responsable(s) de la coopération oncogénique. Ceci pourra orienter vers la région du récepteur Fc γ RIIB importante pour un processus type tumorigenèse (ITIM ou non, par exemple).

Une autre approche expérimentale à développer serait l'approche transcriptomique. Ceci pourra évaluer de manière globale les dérégulations cellulaires pouvant être provoquées par la dérégulation de l'expression de Fc γ RIIB dans les lymphomes. A ce titre le laboratoire d'Hématologie Cellulaire et Moléculaire du CHU de Grenoble (Pr D Leroux) a récemment identifié deux nouveaux cas de remaniement du gène *FCGR2B*. Ces expériences s'intègrent dans un projet plus vaste de transcriptome sur puces Affymetrix des patients avec anomalies du bras long du chromosome 1 (collaboration avec le CHU de Montpellier / Dr John De Vos). Actuellement nous travaillons sur l'analyse type transcriptome des cellules de la lignée B593 après traitement par l'anticorps FLI 8.26. Il serait particulièrement intéressant de réaliser une double approche « knock-down » Fc γ RIIB/transcriptome. A travers ces expériences, nous pourrions accélérer l'identification des voies oncogéniques potentiellement liées à la dérégulation de *FCGR2B* dans les lymphomes folliculaires permettant ainsi de mieux comprendre l'émergence et l'évolution de cette maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* 9(2): 423-32.
- Algeciras-Schimmich, A., L. Shen, et al. (2002). "Molecular ordering of the initial signaling events of CD95." *Mol Cell Biol* 22(1): 207-20.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* 403(6769): 503-11.
- Ameisen, J. C., A. Chikh, et al. (2005). "[This death which is necessary for life]." *J Soc Biol* 199(3): 267-76.
- Amigorena, S. and C. Bonnerot (1999). "Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules." *Semin Immunol* 11(6): 385-90.
- Amigorena, S., D. Lankar, et al. (1998). "Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens." *J Exp Med* 187(4): 505-15.
- Amigorena, S., C. Bonnerot, et al. (1992). "Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes." *Science* 256(5065): 1808-12.
- Antonsson, B., S. Montessuit, et al. (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." *Biochem J* 345 Pt 2: 271-8.
- Ashman, R. F., D. Peckham, et al. (1996). "Fc receptor off-signal in the B cell involves apoptosis." *J Immunol* 157(1): 5-11.
- Bao, Q. and Y. Shi (2006). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." *Cell Death Differ*.
- Beere, H. M. (2004). "'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2641-51.
- Beere, H. M., B. B. Wolf, et al. (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." *Nat Cell Biol* 2(8): 469-75.
- Belostocki, K., M. S. Park, et al. (2005). "FcγRIIa is a target for modulation by TNFα in human neutrophils." *Clin Immunol* 117(1): 78-86.
- Berard, M., M. Casamayor-Palleja, et al. (1999). "Activation sensitizes human memory B cells to B-cell receptor-induced apoptosis." *Immunology* 98(1): 47-54.
- Bergtold, A., D. D. Desai, et al. (2005). "Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells." *Immunity* 23(5): 503-14.
- Blank, M. C., R. N. Stefanescu, et al. (2005). "Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus." *Hum Genet* 117(2-3): 220-7.

- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 725-31.
- Bolland, S., Y. S. Yim, et al. (2002). "Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in FcgammaRIIB(-/-) mice." *J Exp Med* 195(9): 1167-74.
- Bolland, S. and J. V. Ravetch (1999). "Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors." *Adv Immunol* 72: 149-77.
- Bolland, S., R. N. Pearse, et al. (1998). "SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk." *Immunity* 8(4): 509-16.
- Bouillet, P. and A. Strasser (2002). "BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death." *J Cell Sci* 115(Pt 8): 1567-74.
- Boyce, M., A. Degterev, et al. (2004). "Caspases: an ancient cellular sword of Damocles." *Cell Death Differ* 11(1): 29-37.
- Braakman, E., J. G. van de Winkel, et al. (1992). "CD16 on human gamma delta T lymphocytes: expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes." *Cell Immunol* 143(1): 97-107.
- Brancolini, C., A. Sgorbissa, et al. (1998). "Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis." *Cell Death Differ* 5(12): 1042-50.
- Brauweiler, A. M. and J. C. Cambier (2004). "Autonomous SHIP-dependent FcgammaR signaling in pre-B cells leads to inhibition of cell migration and induction of cell death." *Immunol Lett* 92(1-2): 75-81.
- Brauweiler, A. M. and J. C. Cambier (2003). "Fc gamma RIIB activation leads to inhibition of signalling by independently ligated receptors." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 281-5.
- Brauweiler, A., I. Tamir, et al. (2001). "Partially distinct molecular mechanisms mediate inhibitory FcgammaRIIB signaling in resting and activated B cells." *J Immunol* 167(1): 204-11.
- Brooks, D. G., W. Q. Qiu, et al. (1989). "Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes." *J Exp Med* 170(4): 1369-85.
- Brown, K. S., D. Blair, et al. (2004). "FcgammaRIIb-mediated negative regulation of BCR signalling is associated with the recruitment of the MAPkinase-phosphatase, Pac-1, and the 3'-inositol phosphatase, PTEN." *Cell Signal* 16(1): 71-80.
- Bruey, J. M., C. Ducasse, et al. (2000a). "Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c." *Nat Cell Biol* 2(9): 645-52.
- Bruey, J. M., C. Paul, et al. (2000b). "Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo." *Oncogene* 19(42): 4855-63.
- Bump, N. J., M. Hackett, et al. (1995). "Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35." *Science* 269(5232): 1885-8.
- Buttgereit, F., G. R. Burmester, et al. (2000). "Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects." *Immunol Today* 21(4): 192-9.

- Callanan, M. B., P. Le Baccon, et al. (2000). "The IgG Fc receptor, FcgammaRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 309-14.
- Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." *J Immunol* 155(7): 3281-5.
- Camilleri-Broet, S., N. Mounier, et al. (2004a). "FcgammaRIIB expression in diffuse large B-cell lymphomas does not alter the response to CHOP+rituximab (R-CHOP)." *Leukemia* 18(12): 2038-40.
- Camilleri-Broet, S., L. Cassard, et al. (2004b). "FcgammaRIIB is differentially expressed during B cell maturation and in B-cell lymphomas." *Br J Haematol* 124(1): 55-62.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." *Science* 282(5394): 1717-21.
- Carter, N. A. and M. M. Harnett (2004). "Dissection of the signalling mechanisms underlying FcgammaRIIB-mediated apoptosis of mature B-cells." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 973-5.
- Cartron, G., L. Dacheux, et al. (2002). "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene." *Blood* 99(3): 754-8.
- Carver, D. J., M. J. Aman, et al. (2000). "SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization." *Blood* 96(4): 1449-56.
- Casamayor-Palleja, M., J. Feuillard, et al. (1996). "Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations." *Int Immunol* 8(5): 737-44.
- Cassel, D. L., M. A. Keller, et al. (1993). "Differential expression of Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIB and Fc gamma RIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts." *Mol Immunol* 30(5): 451-60.
- Chan, V. W., C. A. Lowell, et al. (1998). "Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn-deficient B lymphocytes." *Curr Biol* 8(10): 545-53.
- Chan, V. W., F. Meng, et al. (1997). "Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation." *Immunity* 7(1): 69-81.
- Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1998). "BCL-2 family: regulators of cell death." *Annu Rev Immunol* 16: 395-419.
- Charette, S. J., J. N. Lavoie, et al. (2000). "Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27." *Mol Cell Biol* 20(20): 7602-12.
- Chen, W., N. Palanisamy, et al. (2001). "Deregulation of FCGR2B expression by 1q21 rearrangements in follicular lymphomas." *Oncogene* 20(52): 7686-93.
- Cheng, E. H., D. G. Kirsch, et al. (1997). "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases." *Science* 278(5345): 1966-8.
- Chiang, H. L., S. R. Terlecky, et al. (1989). "A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins." *Science* 246(4928): 382-5.

- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, et al. (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." *Cell Death Differ* 13(8): 1396-402.
- Clynes, R. (2006). "Antitumor antibodies in the treatment of cancer: Fc receptors link opsonic antibody with cellular immunity." *Hematol Oncol Clin North Am* 20(3): 585-612.
- Clynes, R. A., T. L. Towers, et al. (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." *Nat Med* 6(4): 443-6.
- Clynes, R., J. S. Maizes, et al. (1999). "Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors." *J Exp Med* 189(1): 179-85.
- Coggeshall, K. M. (1998). "Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB." *Curr Opin Immunol* 10(3): 306-12.
- Cogliatti, S. B. and U. Schmid (2002). "Who is WHO and what was REAL?" *Swiss Med Wkly* 132(43-44): 607-17.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.
- Cohen-Solal, J. F., L. Cassard, et al. (2004). "Fc gamma receptors." *Immunol Lett* 92(3): 199-205.
- Coiffier, B. (2006). "Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas." *C R Biol* 329(4): 241-54.
- Cone, J. C., Y. Lu, et al. (1993). "Association of the p56lck protein tyrosine kinase with the Fc gamma RIIB/CD16 complex in human natural killer cells." *Eur J Immunol* 23(10): 2488-97.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* 22(53): 8590-607.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-56.
- Cregan, S. P., V. L. Dawson, et al. (2004). "Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death." *Oncogene* 23(16): 2785-96.
- Critchlow, S. E., R. P. Bowater, et al. (1997). "Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV." *Curr Biol* 7(8): 588-98.
- Crow, A. R., S. Song, et al. (2003). "IVIg-mediated amelioration of murine ITP via Fc gamma RIIB is independent of SHIP1, SHP-1, and Btk activity." *Blood* 102(2): 558-60.
- Crowley, M. T., P. S. Costello, et al. (1997). "A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages." *J Exp Med* 186(7): 1027-39.
- Daeron, M. and R. Lesourne (2006). "Negative signaling in Fc receptor complexes." *Adv Immunol* 89: 39-86.
- Daeron, M. (1997). "Fc receptor biology." *Annu Rev Immunol* 15: 203-34.
- Daeron, M. (1996). "Building up the family of ITIM-bearing negative coreceptors." *Immunol Lett* 54(2-3): 73-6.
- Daeron, M., S. Latour, et al. (1995). "The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation." *Immunity* 3(5): 635-46.

- D'Ambrosio, D., D. C. Fong, et al. (1996). "The SHIP phosphatase becomes associated with Fc gammaRIIB1 and is tyrosine phosphorylated during 'negative' signaling." *Immunol Lett* 54(2-3): 77-82.
- D'Ambrosio, D., K. L. Hippen, et al. (1995). "Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1." *Science* 268(5208): 293-7.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-19.
- Danial, N. N., C. F. Gramm, et al. (2003). "BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis." *Nature* 424(6951): 952-6.
- Danska, J. S. and C. J. Guidos (1997). "Essential and perilous: V(D)J recombination and DNA damage checkpoints in lymphocyte precursors." *Semin Immunol* 9(3): 199-206.
- Dave, S. S., G. Wright, et al. (2004). "Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells." *N Engl J Med* 351(21): 2159-69.
- Davis, R. S., G. R. Ehrhardt, et al. (2005). "An extended family of Fc receptor relatives." *Eur J Immunol* 35(3): 674-80.
- Davis, R. S., R. P. Stephan, et al. (2004). "Differential B cell expression of mouse Fc receptor homologs." *Int Immunol* 16(9): 1343-53.
- Davis, R. S., G. Dennis, Jr., et al. (2002). "Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family." *Immunol Rev* 190: 123-36.
- Davis, R. S., Y. H. Wang, et al. (2001). "Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9772-7.
- de Andres, B., A. L. Mueller, et al. (1998). "A regulatory role for Fc gamma receptors CD16 and CD32 in the development of murine B cells." *Blood* 92(8): 2823-9.
- Deas, O., C. Dumont, et al. (1998). "Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes." *J Immunol* 161(7): 3375-83.
- Defrance, T., M. Casamayor-Palleja, et al. (2002). "The life and death of a B cell." *Adv Cancer Res* 86: 195-225.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* 22(53): 8543-67.
- Delettre, C., V. J. Yuste, et al. (2006a). "Identification and characterization of AIFsh2, a mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) isoform with NADH oxidase activity." *J Biol Chem* 281(27): 18507-18.
- Delettre, C., V. J. Yuste, et al. (2006b). "AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer." *J Biol Chem* 281(10): 6413-27.
- Desiderio, S. (1995). "Lymphopoiesis. Transcription factors controlling B-cell development." *Curr Biol* 5(6): 605-8.
- Didelot, C., E. Schmitt, et al. (2006). "Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death." *Handb Exp Pharmacol*(172): 171-98.
- Distelhorst, C. W. and G. C. Shore (2004). "Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface." *Oncogene* 23(16): 2875-80.

- Dorner, T., S. J. Foster, et al. (1998). "Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest* 102(4): 688-94.
- Doughty, C. A., B. F. Bleiman, et al. (2006). "Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth." *Blood* 107(11): 4458-65.
- Douglass, E. C., I. T. Magrath, et al. (1980). "Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma." *Blood* 55(1): 148-55.
- Drenou, B., V. Blancheteau, et al. (1999). "A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes." *J Immunol* 163(8): 4115-24.
- Droin, N. M. and D. R. Green (2004). "Role of Bcl-2 family members in immunity and disease." *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 179-88.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102(1): 33-42.
- Ehrhardt, G. R., J. T. Hsu, et al. (2005). "Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells." *J Exp Med* 202(6): 783-91.
- Ehrhardt, G. R., R. S. Davis, et al. (2003). "The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13489-94.
- Ehrnsperger, M., H. Lilie, et al. (1999). "The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species." *J Biol Chem* 274(21): 14867-74.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* 391(6662): 43-50.
- Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* 20(3): 929-35.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." *Nature* 405(6782): 85-90.
- 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): 414-22.
- Falini, B., E. Tiacci, et al. (2003). "Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)." *Blood* 102(10): 3684-92.
- Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." *Nat Cell Biol* 3(11): E255-63.
- Ferri, K. F. and G. Kroemer (2000). "Control of apoptotic DNA degradation." *Nat Cell Biol* 2(4): E63-4.
- Fisher, S. G. and R. I. Fisher (2004). "The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma." *Oncogene* 23(38): 6524-34.
- Fitzer-Attas, C. J., M. Lowry, et al. (2000). "Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn." *J Exp Med* 191(4): 669-82.

- Fleury, C., B. Mignotte, et al. (2002). "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling." *Biochimie* 84(2-3): 131-41.
- Floto, R. A., M. R. Clatworthy, et al. (2005). "Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts." *Nat Med* 11(10): 1056-8.
- Follezou, J. Y., J. Emerit, et al. (1999). "[Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis]." *Presse Med* 28(30): 1661-6.
- Fong, D. C., A. Brauweiler, et al. (2000). "Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling." *J Immunol* 165(8): 4453-62.
- Fong, D. C., O. Malbec, et al. (1996). "Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation." *Immunol Lett* 54(2-3): 83-91.
- Fox, C. J., P. S. Hammerman, et al. (2005). "Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response." *Nat Rev Immunol* 5(11): 844-52.
- Freshney, N. W., L. Rawlinson, et al. (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell* 78(6): 1039-49.
- Fukuyama, H., F. Nimmerjahn, et al. (2005). "The inhibitory Fcγ receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G+ anti-DNA plasma cells." *Nat Immunol* 6(1): 99-106.
- Gamberale, R., P. Fernandez-Calotti, et al. (2005). "Signaling capacity of FcγRII isoforms in B-CLL cells." *Leuk Res* 29(11): 1277-84.
- Ganesan, L. P., H. Fang, et al. (2003). "The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Fc gamma RIla to modulate signaling events in myeloid cells." *J Biol Chem* 278(37): 35710-7.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, et al. (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors." *J Biol Chem* 273(49): 32608-13.
- Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." *Cell Death Differ* 13(9): 1423-33.
- Garrido, C., S. Gurbuxani, et al. (2001). "Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 286(3): 433-42.
- Garrido, C., J. M. Bruey, et al. (1999). "HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9." *Faseb J* 13(14): 2061-70.
- Garrido, C., A. Fromentin, et al. (1998). "Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones." *Cancer Res* 58(23): 5495-9.
- Garrido, C., P. Ottavi, et al. (1997). "HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs." *Cancer Res* 57(13): 2661-7.
- Gauld, S. B., J. M. Dal Porto, et al. (2002). "B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease." *Science* 296(5573): 1641-2.

- Gellert, M. (2002). "V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation." *Annu Rev Biochem* 71: 101-32.
- Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." *Nature* 355(6355): 33-45.
- Goldstein, J. C., C. Munoz-Pinedo, et al. (2005). "Cytochrome c is released in a single step during apoptosis." *Cell Death Differ* 12(5): 453-62.
- Gonzalez-Garcia, M., I. Garcia, et al. (1995). "bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4304-8.
- Goossens, T., U. Klein, et al. (1998). "Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2463-8.
- Gordon, J., C. H. Wu, et al. (2003). "Beta2-microglobulin induces caspase-dependent apoptosis in the CCRF-HSB-2 human leukemia cell line independently of the caspase-3, -8 and -9 pathways but through increased reactive oxygen species." *Int J Cancer* 103(3): 316-27.
- Gowans, J. L. (1965). "The Role of Lymphocytes in the Destruction of Homografts." *Br Med Bull* 21: 106-10.
- Green, D. R. (2005). "Apoptotic pathways: ten minutes to dead." *Cell* 121(5): 671-4.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." *Science* 305(5684): 626-9.
- Greer, W. L., C. L. Lee, et al. (2003). "Case of acute lymphoblastic leukemia presenting with t(14;18)/BCL2, t(8;14)/cMYC, and t(1;2)/FCGR2B." *Am J Hematol* 74(2): 112-8.
- Grinberg, M., R. Sarig, et al. (2002). "tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis." *J Biol Chem* 277(14): 12237-45.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, et al. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." *Blood* 84(5): 1361-92.
- Hartl, F. U. and J. Martin (1995). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Curr Opin Struct Biol* 5(1): 92-102.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*." *Curr Opin Genet Dev* 4(4): 581-6.
- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* 1(6): 489-95.
- Honjo, T., M. Muramatsu, et al. (2004). "AID: how does it aid antibody diversity?" *Immunity* 20(6): 659-68.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12401-6.
- Huang, Z. Y., D. R. Barreda, et al. (2006). "Differential kinase requirements in human and mouse Fc-gamma receptor phagocytosis and endocytosis." *J Leukoc Biol*.

- Huang, Z. Y., S. Hunter, et al. (2003). "The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fc gamma receptors Fc gamma RIIB and Fc gamma RIIA." *J Leukoc Biol* 73(6): 823-9.
- Hulett, M. D. and P. M. Hogarth (1994). "Molecular basis of Fc receptor function." *Adv Immunol* 57: 1-127.
- Huot, J., G. Roy, et al. (1991). "Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein." *Cancer Res* 51(19): 5245-52.
- Husson, H., E. G. Carideo, et al. (2002). "Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays." *Blood* 99(1): 282-9.
- Ierino, F. L., M. D. Hulett, et al. (1993). "Mapping epitopes of human Fc gamma RII (CDw32) with monoclonal antibodies and recombinant receptors." *J Immunol* 150(5): 1794-803.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* 2(4): 277-88.
- Imaizumi, K., T. Morihara, et al. (1999). "The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein." *J Biol Chem* 274(12): 7975-81.
- Indik, Z. K., J. G. Park, et al. (1995). "The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis." *Blood* 86(12): 4389-99.
- Irisarri, M., J. Plumas, et al. (2000). "Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line." *Leukemia* 14(12): 2149-58.
- Ishitsuka, K., T. Hideshima, et al. (2005). "Novel inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor VX-944 induces apoptosis in multiple myeloma cells primarily via caspase-independent AIF/Endo G pathway." *Oncogene* 24(38): 5888-96.
- Isnardi, I., P. Bruhns, et al. (2006). "The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human Fc gamma RIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation." *Immunol Lett* 104(1-2): 156-65.
- Isnardi, I., R. Lesourne, et al. (2004). "Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor Fc gamma RIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap." *J Biol Chem* 279(50): 51931-8.
- Ivan, E. and A. I. Colovai (2006). "Human Fc receptors: critical targets in the treatment of autoimmune diseases and transplant rejections." *Hum Immunol* 67(7): 479-91.
- Iwasaki, M., T. Kuwata, et al. (2005). "Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model." *Blood* 105(2): 784-93.
- Jaattela, M. (2004). "Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression." *Oncogene* 23(16): 2746-56.
- Jaattela, M. and J. Tschopp (2003). "Caspase-independent cell death in T lymphocytes." *Nat Immunol* 4(5): 416-23.

- Jaattela, M. (1995). "Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells." *Int J Cancer* 60(5): 689-93.
- Jemal, A., T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." *CA Cancer J Clin* 55(1): 10-30.
- Jiang, Y., S. Hirose, et al. (2000). "Polymorphisms in IgG Fc receptor IIB regulatory regions associated with autoimmune susceptibility." *Immunogenetics* 51(6): 429-35.
- Jin, Y. H., K. J. Yoo, et al. (2000). "Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells." *J Biol Chem* 275(39): 30256-63.
- Jolly, C. and R. I. Morimoto (2000). "Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death." *J Natl Cancer Inst* 92(19): 1564-72.
- Joshi, T., L. P. Ganesan, et al. (2006). "Molecular analysis of expression and function of hFcgammaRIIb1 and b2 isoforms in myeloid cells." *Mol Immunol* 43(7): 839-50.
- Kalergis, A. M. and J. V. Ravetch (2002). "Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcgamma receptors on dendritic cells." *J Exp Med* 195(12): 1653-9.
- Kang, S. J., S. Wang, et al. (2002). "Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response." *Cell Death Differ* 9(10): 1115-25.
- Karasuyama, H., A. Rolink, et al. (1993). "A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines." *J Exp Med* 178(2): 469-78.
- Kato, I., T. Takai, et al. (2002). "The pre-B cell receptor signaling for apoptosis is negatively regulated by Fc gamma RIIB." *J Immunol* 168(2): 629-34.
- Kato, K., K. Hasegawa, et al. (1994). "Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27." *J Biol Chem* 269(15): 11274-8.
- Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." *Trends Cell Biol* 11(12): 526-34.
- Kenter, A. L. (2003). "Class-switch recombination: after the dawn of AID." *Curr Opin Immunol* 15(2): 190-8.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Kim, T. H., Y. Zhao, et al. (2000). "Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax." *J Biol Chem* 275(50): 39474-81.
- Kirsch, I. R. and F. Lista (1997). "Lymphocyte-specific genomic instability and risk of lymphoid malignancy." *Semin Immunol* 9(3): 207-15.
- Klein, U., T. Goossens, et al. (1998). "Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells." *Immunol Rev* 162: 261-80.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzal, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* 275(5303): 1132-6.

- Knudson, C. M., K. S. Tung, et al. (1995). "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." *Science* 270(5233): 96-9.
- Koenig, U., L. Eckhart, et al. (2001). "Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene." *Biochem Biophys Res Commun* 285(5): 1150-4.
- Koncz, G., G. K. Toth, et al. (2001). "Co-clustering of Fc γ and B cell receptors induces dephosphorylation of the Grb2-associated binder 1 docking protein." *Eur J Biochem* 268(14): 3898-906.
- Koncz, G., I. Pecht, et al. (1999). "Fc γ receptor-mediated inhibition of human B cell activation: the role of SHP-2 phosphatase." *Eur J Immunol* 29(6): 1980-9.
- Koncz, G., J. Gergely, et al. (1998). "Fc γ RIIb inhibits both B cell receptor- and CD19-induced Ca²⁺ mobilization in Fc γ R-transfected human B cells." *Int Immunol* 10(2): 141-6.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell Death Differ* 7(12): 1166-73.
- Kothakota, S., T. Azuma, et al. (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* 278(5336): 294-8.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* 407(6805): 789-95.
- Kreuter, M. W., C. Sugg-Skinner, et al. (2005). "Cultural tailoring for mammography and fruit and vegetable intake among low-income African-American women in urban public health centers." *Prev Med* 41(1): 53-62.
- Kuppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." *Nat Rev Cancer* 5(4): 251-62.
- Kuppers, R. (2004). "Prognosis in follicular lymphoma--it's in the microenvironment." *N Engl J Med* 351(21): 2152-3.
- Kuppers, R., U. Klein, et al. (1999). "Cellular origin of human B-cell lymphomas." *N Engl J Med* 341(20): 1520-9.
- Kwon, J., K. B. Morshead, et al. (2000). "Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA." *Mol Cell* 6(5): 1037-48.
- Kyogoku, C., H. M. Dijkstra, et al. (2002). "Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility." *Arthritis Rheum* 46(5): 1242-54.
- Lamkanfi, M., M. Kalai, et al. (2004). "Caspase-12: an overview." *Cell Death Differ* 11(4): 365-8.
- Laroya, G., R. Cuesta, et al. (1999). "Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway." *Science* 284(5413): 499-502.
- Lavrik, I. N., A. Golks, et al. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." *J Clin Invest* 115(10): 2665-72.
- Lees-Miller, S. P. and K. Meek (2003). "Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining." *Biochimie* 85(11): 1161-73.

- Leu, C. M., R. S. Davis, et al. (2005). "FcRH1: an activation coreceptor on human B cells." *Blood* 105(3): 1121-6.
- Lewis, J., A. Devin, et al. (2000). "Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation." *J Biol Chem* 275(14): 10519-26.
- Li, X., J. Wu, et al. (2003). "A novel polymorphism in the Fcgamma receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling." *Arthritis Rheum* 48(11): 3242-52.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* 412(6842): 95-9.
- Li, C. Y., J. S. Lee, et al. (2000). "Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation." *J Biol Chem* 275(33): 25665-71.
- Limpens, J., R. Stad, et al. (1995). "Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals." *Blood* 85(9): 2528-36.
- Lin, W. C. and S. Desiderio (1995). "V(D)J recombination and the cell cycle." *Immunol Today* 16(6): 279-89.
- Lin, W. C. and S. Desiderio (1993). "Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation." *Science* 260(5110): 953-9.
- Lindquist, S. (1986). "The heat-shock response." *Annu Rev Biochem* 55: 1151-91.
- Liston, P., W. G. Fong, et al. (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." *Oncogene* 22(53): 8568-80.
- Lithgow, T., R. van Driel, et al. (1994). "The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane." *Cell Growth Differ* 5(4): 411-7.
- Liu, Q., T. Sasaki, et al. (1999). "SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival." *Genes Dev* 13(7): 786-91.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." *Cell* 89(2): 175-84.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* 86(1): 147-57.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(7): 545-50.
- Loeffler, M., E. Daugas, et al. (2001). "Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor." *Faseb J* 15(3): 758-67.
- Lucken-Ardjomande, S., S. Montessuit, et al. (2005). "[Changes in the outer mitochondrial membranes during apoptosis]." *J Soc Biol* 199(3): 207-10.
- Ly, J. D., D. R. Grubb, et al. (2003). "The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update." *Apoptosis* 8(2): 115-28.

- Lyden, T. W., J. M. Robinson, et al. (2001). "The Fc receptor for IgG expressed in the villus endothelium of human placenta is Fc gamma RIIB2." *J Immunol* 166(6): 3882-9.
- Macardle, P. J., C. Mardell, et al. (2002). "FcgammaRIIB expression on human germinal center B lymphocytes." *Eur J Immunol* 32(12): 3736-44.
- MacRae, T. H. (2000). "Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas." *Cell Mol Life Sci* 57(6): 899-913.
- Malbec, O., C. Schmitt, et al. (2001). "Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 mediates cell cycle arrest by FcgammaRIIB." *J Biol Chem* 276(32): 30381-91.
- Malbec, O., W. H. Fridman, et al. (1999). "Negative regulation of c-kit-mediated cell proliferation by Fc gamma RIIB." *J Immunol* 162(8): 4424-9.
- Maltais, L. J., R. C. Lovering, et al. (2006). "New nomenclature for Fc receptor-like molecules." *Nat Immunol* 7(5): 431-2.
- Manis, J. P., M. Tian, et al. (2002). "Mechanism and control of class-switch recombination." *Trends Immunol* 23(1): 31-9.
- Mantzioris, B. X., M. F. Berger, et al. (1993). "Expression of the Fc receptor for IgG (Fc gamma RII/CDw32) by human circulating T and B lymphocytes." *J Immunol* 150(11): 5175-84.
- Maresco, D. L., E. Chang, et al. (1996). "The three genes of the human FCGR1 gene family encoding Fc gamma RI flank the centromere of chromosome 1 at 1p12 and 1q21." *Cytogenet Cell Genet* 73(3): 157-63.
- Marsden, V. S. and A. Strasser (2003). "Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more." *Annu Rev Immunol* 21: 71-105.
- Martin, S. J., D. M. Finucane, et al. (1996). "Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity." *J Biol Chem* 271(46): 28753-6.
- Martin, J. and F. U. Hartl (1994). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Bioessays* 16(9): 689-92.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." *J Exp Med* 187(8): 1261-71.
- Matsuda, M., J. G. Park, et al. (1996). "Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides." *Mol Biol Cell* 7(7): 1095-106.
- McBlane, F. and J. Boyes (2000). "Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation." *Curr Biol* 10(8): 483-6.
- McDonnell, T. J. and S. J. Korsmeyer (1991). "Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)." *Nature* 349(6306): 254-6.
- McDonnell, T. J., N. Deane, et al. (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." *Cell* 57(1): 79-88.

- McEarchern, J. A., E. Oflazoglu, et al. (2006). "Engineered anti-CD70 antibody with multiple effector functions exhibits in vitro and in vivo antitumor activities." *Blood*.
- McIlroy, D., M. Tanaka, et al. (2000). "An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes." *Genes Dev* 14(5): 549-58.
- McMurry, M. T. and M. S. Krangel (2000). "A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination." *Science* 287(5452): 495-8.
- Medgyesi, D., R. Sarkozi, et al. (2004). "Functional consequences of a MAPK docking site on human Fc γ R2b." *Immunol Lett* 92(1-2): 83-90.
- Mehlen, P., C. Kretz-Remy, et al. (1996). "Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death." *Embo J* 15(11): 2695-706.
- Mehlen, P. and A. P. Arrigo (1994). "The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization." *Eur J Biochem* 221(1): 327-34.
- Melchers, F., H. Karasuyama, et al. (1993). "The surrogate light chain in B-cell development." *Immunol Today* 14(2): 60-8.
- Meriin, A. B., J. A. Yaglom, et al. (1999). "Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72." *Mol Cell Biol* 19(4): 2547-55.
- Metes, D., L. K. Ernst, et al. (1998). "Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the Fc γ R2C gene." *Blood* 91(7): 2369-80.
- Mikhailov, V., M. Mikhailova, et al. (2003). "Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release." *J Biol Chem* 278(7): 5367-76.
- Mikolajczyk, J., F. L. Scott, et al. (2004). "Activation and substrate specificity of caspase-14." *Biochemistry* 43(32): 10560-9.
- Miller, I., G. Hatzivassiliou, et al. (2002). "IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells." *Blood* 99(8): 2662-9.
- Minskoff, S. A., K. Matter, et al. (1998). "Fc γ R2-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens." *J Immunol* 161(5): 2079-83.
- Mitchell, M. A., M. M. Huang, et al. (1994). "Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc γ R2A: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis." *Blood* 84(6): 1753-9.
- Mitelman, F., F. Mertens, et al. (1997). "A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia." *Nat Genet* 15 Spec No: 417-74.
- Mohamed, A. J., L. Vargas, et al. (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of Bruton's tyrosine kinase." *J Biol Chem* 275(51): 40614-9.

- Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* 68(5): 869-77.
- Mosser, D. D., A. W. Caron, et al. (2000). "The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis." *Mol Cell Biol* 20(19): 7146-59.
- Muraille, E., P. Bruhns, et al. (2000). "The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 associates to the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of Fc gammaRIIB in B cells under negative signaling." *Immunol Lett* 72(1): 7-15.
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, et al. (1999). "Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells." *J Biol Chem* 274(26): 18470-6.
- Muta, T., T. Kurosaki, et al. (1994). "A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling." *Nature* 369(6478): 340.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* 273(5): 2926-30.
- Nagata, K., T. Nakamura, et al. (1997). "The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation." *Immunity* 7(4): 559-70.
- Nagy, Z. A. and N. A. Mooney (2003). "A novel, alternative pathway of apoptosis triggered through class II major histocompatibility complex molecules." *J Mol Med* 81(12): 757-65.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, et al. (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." *Nature* 434(7033): 652-8.
- Nakamura, A., T. Yuasa, et al. (2000). "Fc gamma receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease." *J Exp Med* 191(5): 899-906.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, et al. (2001). "Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis." *J Cell Biol* 153(6): 1265-76.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2006). "Fc gamma receptors: old friends and new family members." *Immunity* 24(1): 19-28.
- Nimmerjahn, F., P. Bruhns, et al. (2005). "Fc gamma RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity." *Immunity* 23(1): 41-51.
- Ninomiya, N., K. Hazeki, et al. (1994). "Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling." *J Biol Chem* 269(36): 22732-7.
- Nitschke, L. and T. Tsubata (2004). "Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72." *Trends Immunol* 25(10): 543-50.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* 288(5468): 1053-8.
- Oesterreich, S., C. N. Weng, et al. (1993). "The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines." *Cancer Res* 53(19): 4443-8.

- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, et al. (1990). "RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination." *Science* 248(4962): 1517-23.
- Okada, M., S. Adachi, et al. (2004). "A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity." *Blood* 103(6): 2299-307.
- Okazaki, I. M., H. Hiai, et al. (2003). "Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis." *J Exp Med* 197(9): 1173-81.
- Ono, M., H. Okada, et al. (1997). "Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling." *Cell* 90(2): 293-301.
- Ono, M., S. Bolland, et al. (1996). "Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB." *Nature* 383(6597): 263-6.
- Orlofsky, A., L. M. Weiss, et al. (2002). "Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response." *J Immunol* 168(4): 1840-6.
- Orrenius, S. (2004). "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death." *Toxicol Lett* 149(1-3): 19-23.
- Osmond, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." *Immunol Today* 14(1): 34-7.
- Osmond, D. G. (1991). "Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs." *Curr Opin Immunol* 3(2): 179-85.
- Otera, H., S. Ohsakaya, et al. (2005). "Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space." *Embo J* 24(7): 1375-86.
- Pan, L. and P. Pei (2003). "Signaling transduction by IgG receptors." *Chin Med J (Engl)* 116(4): 487-94.
- Pandey, P., R. Farber, et al. (2000). "Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3." *Oncogene* 19(16): 1975-81.
- Pandey, P., A. Saleh, et al. (2000). "Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90." *Embo J* 19(16): 4310-22.
- Parcellier, A., E. Schmitt, et al. (2003). "HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation." *Mol Cell Biol* 23(16): 5790-802.
- Park, H. S., J. S. Lee, et al. (2001). "Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase." *Embo J* 20(3): 446-56.
- Parsell, D. A. and S. Lindquist (1993). "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins." *Annu Rev Genet* 27: 437-96.
- Patenge, N., S. K. Elkin, et al. (2004). "ATP-dependent remodeling by SWI/SNF and ISWI proteins stimulates V(D)J cleavage of 5 S arrays." *J Biol Chem* 279(34): 35360-7.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, et al. (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Curr Biol* 10(15): 886-95.
- Pearse, R. N., T. Kawabe, et al. (1999). "SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis." *Immunity* 10(6): 753-60.

- Pelletier, N., M. Casamayor-Palleja, et al. (2006). "The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway." *J Immunol* 176(3): 1340-7.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis." *Curr Opin Immunol* 10(5): 545-51.
- Petros, A. M., E. T. Olejniczak, et al. (2004). "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins." *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 83-94.
- Pham, N. A. and D. W. Hedley (2001). "Respiratory chain-generated oxidative stress following treatment of leukemic blasts with DNA-damaging agents." *Exp Cell Res* 264(2): 345-52.
- Phillips, N. E., K. A. Gravel, et al. (1988). "IL-4 (B cell stimulatory factor 1) overcomes Fc gamma receptor-mediated inhibition of mouse B lymphocyte proliferation without affecting inhibition of c-myc mRNA induction." *J Immunol* 141(12): 4243-9.
- Phillips, N. E. and D. C. Parker (1984). "Cross-linking of B lymphocyte Fc gamma receptors and membrane immunoglobulin inhibits anti-immunoglobulin-induced blastogenesis." *J Immunol* 132(2): 627-32.
- Pop, C., J. Timmer, et al. (2006). "The apoptosome activates caspase-9 by dimerization." *Mol Cell* 22(2): 269-75.
- Powell, M. S., N. C. Barnes, et al. (2006). "Alteration of the Fc gamma RIIa dimer interface affects receptor signaling but not ligand binding." *J Immunol* 176(12): 7489-94.
- Pricop, L., P. Redecha, et al. (2001). "Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines." *J Immunol* 166(1): 531-7.
- Pritchard, N. R., A. J. Cutler, et al. (2000). "Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor Fc gamma RII." *Curr Biol* 10(4): 227-30.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* 3(3): 287-96.
- Qiu, W. Q., D. de Bruin, et al. (1990). "Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination." *Science* 248(4956): 732-5.
- Rabinovitch, N. and E. W. Gelfand (2004). "Expression of functional activating and inhibitory Fc gamma receptors on human B cells." *Int Arch Allergy Immunol* 133(3): 285-94.
- Rane, M. J., Y. Pan, et al. (2003). "Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation." *J Biol Chem* 278(30): 27828-35.
- Ranger, A. M., B. A. Malynn, et al. (2001). "Mouse models of cell death." *Nat Genet* 28(2): 113-8.
- Rankin, C. T., M. C. Veri, et al. (2006). "CD32B, the human inhibitory Fc-gamma receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma." *Blood* 108(7): 2384-91.
- Rao, S. P., K. A. Vora, et al. (2002). "Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor Fc gamma RIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells." *J Immunol* 169(4): 1859-68.

- Rathmell, J. C., T. Lindsten, et al. (2002). "Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis." *Nat Immunol* 3(10): 932-9.
- Ravetch, J. V. (2002). "A full complement of receptors in immune complex diseases." *J Clin Invest* 110(12): 1759-61.
- Ravetch, J. V. and S. Bolland (2001). "IgG Fc receptors." *Annu Rev Immunol* 19: 275-90.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." *Science* 290(5489): 84-9.
- Ravetch, J. V. and J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." *Annu Rev Immunol* 9: 457-92.
- Ray, S. K., C. Putterman, et al. (1996). "Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 2019-24.
- Regnault, A., D. Lankar, et al. (1999). "Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization." *J Exp Med* 189(2): 371-80.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 897-907.
- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." *Genes Dev* 13(24): 3179-84.
- Rogalla, T., M. Ehrnsperger, et al. (1999). "Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation." *J Biol Chem* 274(27): 18947-56.
- Ross, A. J., K. G. Waymire, et al. (1998). "Testicular degeneration in Bclw-deficient mice." *Nat Genet* 18(3): 251-6.
- Rostovtseva, T. K., B. Antonsson, et al. (2004). "Bid, but not Bax, regulates VDAC channels." *J Biol Chem* 279(14): 13575-83.
- Roth, D. B., C. Zhu, et al. (1993). "Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10788-92.
- Roucou, X., S. Montessuit, et al. (2002). "Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein." *Biochem J* 368(Pt 3): 915-21.
- Ruchaud, S., N. Korfali, et al. (2002). "Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation." *Embo J* 21(8): 1967-77.
- Saito, M., S. J. Korsmeyer, et al. (2000). "BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes." *Nat Cell Biol* 2(8): 553-5.
- Sakahira, H. and S. Nagata (2002). "Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase." *J Biol Chem* 277(5): 3364-70.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." *Nature* 391(6662): 96-9.

- Sakai, T., M. Kogiso, et al. (2006). "Deletion polymorphisms in the promoter region of Fc γ receptor IIB is not associated with antigen-specific IgG2a and IgG2b antibody responses in NC/Nga mice." *Microbiol Immunol* 50(6): 475-80.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (2000). "Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70." *Nat Cell Biol* 2(8): 476-83.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." *J Biol Chem* 274(25): 17941-5.
- Samuelsson, A., T. L. Towers, et al. (2001). "Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor." *Science* 291(5503): 484-6.
- Sandor, M., J. Galon, et al. (1994). "An alternative Fc γ -receptor ligand: potential role in T-cell development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12857-61.
- Sarmay, G., G. Koncz, et al. (1996b). "Human type II Fc γ receptors inhibit B cell activation by interacting with the p21(ras)-dependent pathway." *J Biol Chem* 271(48): 30499-504.
- Sarmay, G., Z. Rozsnyay, et al. (1995). "The alternative splicing of human Fc γ RII mRNA is regulated by activation of B cells with mIgM cross-linking, interleukin-4, or phorbol ester." *Eur J Immunol* 25(1): 262-8.
- Sartorius, U. A. and P. H. Krammer (2002). "Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines." *Int J Cancer* 97(5): 584-92.
- Sato, S., N. Fujita, et al. (2000). "Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10832-7.
- Schafer, Z. T. and S. Kornbluth (2006). "The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation." *Dev Cell* 10(5): 549-61.
- Scharenberg, A. M., O. El-Hillal, et al. (1998). "Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals." *Embo J* 17(7): 1961-72.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, et al. (1992). "V(D)J recombination: molecular biology and regulation." *Annu Rev Immunol* 10: 359-83.
- Schlissel, M., A. Constantinescu, et al. (1993). "Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated." *Genes Dev* 7(12B): 2520-32.
- Schmidt, R. E. and J. E. Gessner (2005). "Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity." *Immunol Lett* 100(1): 56-67.
- Schmitt, E., A. Parcellier, et al. (2003). "Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant." *Cancer Res* 63(23): 8233-40.
- Schmitt, C. A., C. T. Rosenthal, et al. (2000). "Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas." *Nat Med* 6(9): 1029-35.

- Schutte, B., M. Henfling, et al. (2004). "Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis." *Exp Cell Res* 297(1): 11-26.
- Shaffer, A. L., A. Rosenwald, et al. (2002). "Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation." *Nat Rev Immunol* 2(12): 920-32.
- Sharif, M. N., I. Tassioulas, et al. (2004). "IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis." *J Immunol* 172(10): 6476-81.
- Shi, Y. and J. O. Thomas (1992). "The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate." *Mol Cell Biol* 12(5): 2186-92.
- Shimizu, S., T. Ide, et al. (2000). "Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c." *J Biol Chem* 275(16): 12321-5.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." *Cell* 68(5): 855-67.
- Shrivastava, A., M. Tiwari, et al. (2006). "Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway." *J Biol Chem* 281(28): 19762-71.
- Siberil, S., C. A. Dutertre, et al. (2006). "Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences." *Immunol Lett* 106(2): 111-118.
- Sleckman, B. P., J. R. Gorman, et al. (1996). "Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements." *Annu Rev Immunol* 14: 459-81.
- Sreedhar, A. S., E. Kalmar, et al. (2004). "Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance." *FEBS Lett* 562(1-3): 11-5.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." *Mol Cell* 1(7): 949-57.
- Staudt, L. M. and S. Dave (2005). "The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling." *Adv Immunol* 87: 163-208.
- Stavnezer, J. (1996). "Antibody class switching." *Adv Immunol* 61: 79-146.
- Stefanescu, R. N., M. Olfieriev, et al. (2004). "Inhibitory Fc gamma receptors: from gene to disease." *J Clin Immunol* 24(4): 315-26.
- Storb, U., A. Peters, et al. (1998). "Cis-acting sequences that affect somatic hypermutation of Ig genes." *Immunol Rev* 162: 153-60.
- Su, K., J. Wu, et al. (2002). "Genomic organization of classical human low-affinity Fc gamma receptor genes." *Genes Immun* 3 Suppl 1: S51-6.
- Susin, S. A., E. Daugas, et al. (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." *J Exp Med* 192(4): 571-80.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* 397(6718): 441-6.

- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, et al. (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15): 8662-7.
- Suzuki, M., Y. Kase, et al. (2000). "Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48(1): 241-50.
- Takai, T. (2002). "Roles of Fc receptors in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* 2(8): 580-92.
- Takai, T., M. Li, et al. (1994). "FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects." *Cell* 76(3): 519-29.
- Tamir, I., J. C. Stolpa, et al. (2000). "The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcgammaRIIB signals in B cells." *Immunity* 12(3): 347-58.
- Tang, D. and V. J. Kidd (1998). "Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis." *J Biol Chem* 273(44): 28549-52.
- Tanguay, D., S. Pavlovic, et al. (1999). "B cell antigen receptor-mediated activation of cyclin-dependent retinoblastoma protein kinases and inhibition by co-cross-linking with Fc gamma receptors." *J Immunol* 163(6): 3160-8.
- Terada, K., K. Ohtsuka, et al. (1995). "Role of heat shock cognate 70 protein in import of ornithine transcarbamylase precursor into mammalian mitochondria." *Mol Cell Biol* 15(7): 3708-13.
- Terlecky, S. R., H. L. Chiang, et al. (1992). "Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein." *J Biol Chem* 267(13): 9202-9.
- Thangavelu, M., O. Olopade, et al. (1990). "Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of patients with lymphoid malignancies characterized by both t(14;18)(q32;q21) and t(8;14)(q24;q32) or t(8;22)(q24;q11)." *Genes Chromosomes Cancer* 2(2): 147-58.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-6.
- Thornberry, N. A., E. P. Peterson, et al. (1994). "Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones." *Biochemistry* 33(13): 3934-40.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell, et al. (1993). "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells." *J Exp Med* 177(4): 1009-20.
- Toellner, K. M., A. Gulbranson-Judge, et al. (1996). "Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation." *J Exp Med* 183(5): 2303-12.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* 302(5909): 575-81.
- Tridandapani, S., K. Siefker, et al. (2002). "Regulated expression and inhibitory function of Fcgamma RIIB in human monocytic cells." *J Biol Chem* 277(7): 5082-9.
- Tridandapani, S., T. Kelley, et al. (1997). "Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif." *Mol Cell Biol* 17(8): 4305-11.

- Tschopp, J., M. Irmeler, et al. (1998). "Inhibition of fas death signals by FLIPs." *Curr Opin Immunol* 10(5): 552-8.
- Tsitsikov, E. N., R. Fuleihan, et al. (1995). "Cross-linking of Fc gamma receptors activates HIV-1 long terminal repeat-driven transcription in human monocytes." *Int Immunol* 7(10): 1665-70.
- Tsujimoto, Y., J. Gorham, et al. (1985). "The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining." *Science* 229(4720): 1390-3.
- Tycko, B. and J. Sklar (1990). "Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model." *Cancer Cells* 2(1): 1-8.
- Tzeng, S. J., S. Bolland, et al. (2005). "The B cell inhibitory Fc receptor triggers apoptosis by a novel c-Abl family kinase-dependent pathway." *J Biol Chem* 280(42): 35247-54.
- Ungewickell, E. (1985). "The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles." *Embo J* 4(13A): 3385-91.
- Vaandrager, J. W., E. Schuurin, et al. (1998). "DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma." *Blood* 92(8): 2871-8.
- Vairo, G., K. M. Innes, et al. (1996). "Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival." *Oncogene* 13(7): 1511-9.
- Van Crielinge, W., R. Beyaert, et al. (1996). "Functional characterization of the prodomain of interleukin-1beta-converting enzyme." *J Biol Chem* 271(44): 27245-8.
- Van de Craen, M., W. Declercq, et al. (1999). "The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis." *Cell Death Differ* 6(11): 1117-24.
- van de Winkel, J. G. and P. J. Capel (1993). "Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications." *Immunol Today* 14(5): 215-21.
- Van Den Herik-Oudijk, I. E., N. A. Westerdaal, et al. (1994). "Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes." *J Immunol* 152(2): 574-85.
- van Sorge, N. M., W. L. van der Pol, et al. (2003). "FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy." *Tissue Antigens* 61(3): 189-202.
- Vanasse, G. J., P. Concannon, et al. (1999). "Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage." *Blood* 94(12): 3997-4010.
- Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, et al. (2000). "Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4666-71.
- Veis, D. J., C. M. Sorenson, et al. (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." *Cell* 75(2): 229-40.
- Vely, F., N. Gruel, et al. (1997). "A new set of monoclonal antibodies against human Fc gamma RII (CD32) and Fc gamma RIII (CD16): characterization and use in various assays." *Hybridoma* 16(6): 519-28.

- Vely, F. and E. Vivier (1997). "Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts." *J Immunol* 159(5): 2075-7.
- Verhagen, A. M., J. Silke, et al. (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." *J Biol Chem* 277(1): 445-54.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* 102(1): 43-53.
- Villunger, A., E. M. Michalak, et al. (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." *Science* 302(5647): 1036-8.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 15(22): 2922-33.
- Wei, Y., T. Fox, et al. (2000). "The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity." *Chem Biol* 7(6): 423-32.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1998). "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals." *J Biol Chem* 273(12): 7141-7.
- Willis, T. G. and M. J. Dyer (2000). "The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies." *Blood* 96(3): 808-22.
- Wu, Y. C., G. M. Stanfield, et al. (2000). "NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis." *Genes Dev* 14(5): 536-48.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." *Nature* 284(5756): 555-6.
- Wytenbach, A., O. Sauvageot, et al. (2002). "Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin." *Hum Mol Genet* 11(9): 1137-51.
- Xiu, Y., K. Nakamura, et al. (2002). "Transcriptional regulation of Fcgr2b gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses." *J Immunol* 169(8): 4340-6.
- Xu, Y., S. J. Beavitt, et al. (2002). "The activation and subsequent regulatory roles of Lyn and CD19 after B cell receptor ligation are independent." *J Immunol* 169(12): 6910-8.
- Yada, A., S. Ebihara, et al. (2003). "Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by FcgammaRIIB- and FcgammaRI/III-mediated immune complex uptake." *Cell Immunol* 225(1): 21-32.
- Yang, Y. L. and X. M. Li (2000). "The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities." *Cell Res* 10(3): 169-77.
- Yasuda, K., N. Sugita, et al. (2001). "Seven single nucleotide substitutions in human Fc(gamma) receptor IIB gene." *Tissue Antigens* 58(5): 339-42.
- Yin, X. M., K. Wang, et al. (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." *Nature* 400(6747): 886-91.

- Yuasa, T., S. Kubo, et al. (1999). "Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis." *J Exp Med* 189(1): 187-94.
- Zamzami, N. and G. Kroemer (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 67-71.
- Zhang, Y., J. S. Wang, et al. (2004). "Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells." *J Biol Chem* 279(41): 42545-51.
- Zheng, X., S. Abroun, et al. (2006). "Heterogeneous expression of CD32 and CD32-mediated growth suppression in human myeloma cells." *Haematologica* 91(7): 920-8.
- Zhou, P., J. Chou, et al. (1999). "Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11265-70.
- Ziegler, U. and P. Groscurth (2004). "Morphological features of cell death." *News Physiol Sci* 19: 124-8.
- Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." *J Biol Chem* 274(17): 11549-56.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell* 90(3): 405-13.

ANNEXES

I. TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Différenciation des lymphocytes B.	9
Figure 2. Processus moléculaire de réarrangements des gènes d'immunoglobuline.	11
Figure 3. Trois voies possibles quand les cellules B naïves rencontrent l'antigène.	12
Figure 4. Organisation du locus V(D)J.	14
Figure 5. Schéma de la recombinaison V(D)J chez les mammifères.	16
Figure 6. Correspondance entre les cellules B normales et les différents syndromes lymphoprolifératifs	23
Figure 7. Origine, caractère et fréquence des lymphomes de type B	24
Figure 8. Les classifications des lymphomes B Kiel, REAL et WHO.	27
Tableau 1 : Principales translocations récurrentes impliquant le locus IGH.	29
Figure 9. Dépendance des lymphomes B à l'expression du BCR.	32
Figure 10. Interactions cellulaires dans le centre germinatif.	33
Figure 11. Famille des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (Fc γ R).	36
Figure 12. Schéma de l'interaction d'un récepteurs Fc γ de faible affinité avec l'IgG.	37
Figure 13. Localisation chromosomique et organisation génomique des gènes codant pour les Fc γ R.	38
Figure 14. Localisation chromosomique et organisation génomique des gènes codant pour les Fc γ RIV.	44
Figure 15. Les principales fonctions des récepteurs pour le fragment des IgG, les Fc γ R.	46
Figure 16. Points de contrôle des cellules B autoréactives durant le développement.	48
Figure 17. Voies de signalisation BCR-dépendantes.	50
Figure 18. Voies de signalisation négative activées par la co-ligation du BCR et de Fc γ RIIB. ...	50
Figure 19. Mécanismes moléculaires de la régulation négative du récepteur pour l'antigène des Lymphocytes B (BCR) par Fc γ RIIB.	53
Figure 20. Sites potentiels de phosphorylation de la partie intra-cytoplasmique du Fc γ RIIB murin.	56
Figure 21. Modèle de l'apoptose Fc γ RIIB dépendante.	57
Figure 22. Phénotype de souris déficient en Fc γ RIIB.	59

Figure 23. Mécanismes moléculaires de la signalisation par les récepteurs Fc γ activateurs.....	64
Figure 24. Les facteurs génétiques et acquis dans la régulation de l'expression et de la fonction du récepteur Fc γ RIIB.....	68
Tableau 2. Neuf types distincts de mort cellulaire.....	71
Figure 25. Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.....	74
Figure 26. Apoptose chez C. Elegans et chez les mammifères.....	77
Figure 27. La structure de caspases.....	79
Figure 28. Formation de l'apoptosome.....	82
Figure 29. Les principaux substrats des caspases.....	83
Figure 30. Classification et structure de membres de la famille BCL-2.....	86
Figure 31. Mécanismes d'activation de protéines pro-apoptotiques à multi-domaines par les protéines pro-apoptotiques à domaine-BH3.....	89
Figure 32. Régulation des protéines BH3.....	90
Figure 33. Voies des signalisations de l'apoptose.....	91
Figure 34. La voie extrinsèque de l'apoptose (voie des récepteurs de mort).....	92
Figure 35. Les deux voies de signalisation CD95 : cellules de type I et type II.....	94
Figure 36. La voie intrinsèque de l'apoptose: Voie mitochondriale.....	95
Figure 37. Modèle du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mTP).....	96
Tableau 3. Caractéristiques de la voie apoptotique caspase indépendante.....	101
Tableau 4. Les principaux Hsps impliquées dans l'apoptose.....	102
Figure 38: Analyse de l'expression de Fc γ RIIB dans des lignées de lymphomes B humains...	158
Figure 39: Co-engagement du récepteur Fc γ RIIB et BCR dans les lignées B593 et Daudi.....	161
Figure 40: Expression du récepteur Fc γ RIIB dans les clones.....	164
Figure 41: Evaluation par cytométrie de flux de la mort cellulaire Fc γ RIIB dépendante dans les clones 46(b1) et 01(b2).....	166

II. TABLE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

AICD: Mort cellulaire induite par activation

ADN : Acide Desoxyribonucléique

AID : Activation-Induced Deaminase

AIF : Apoptosis inducing-factor

Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1

ANT: Translocase des nucléotides adényliques

ARN : Acide Ribonucléique

BCR : B Cell Recepto

BSA : Bovine Serum Albumine

BTK : Bruton Tyrosin Kinase

CAD: Caspase-activated DNase

CARD: Caspase recruitment domain

CED: *Caenorhabditis elegans* death

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CYP-D : Cyclophiline D

DED : Death Effector Domain

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

DLCL : Diffuse Large Cell Lymphoma

DMSO : Diméthyl sulfoxide

$\Delta\Psi_M$: potential membranaire mitochondrial

FCGR : Fc Gamma Receptor

FcRH : Fc receptor Homologue

FAD: Flavin adenine dinucleotide

FADD: Fas Associated Death Domain

FLICE: FADD-like IL1 β -converting enzyme

FLIP: FLICE caspase-8-Inhibitory Proteins

GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol

HDAC : Histone Deacetylase

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSP: Heat shock protein

IAP: Inhibitor of apoptosis Protein
ICAD: Inhibitor of caspase-activated DNase
IC: Immune complexes
ICE: IL-1beta converting enzyme
Ig : Immunoglobuline
IGH : Ig Heavy Chain
IGL : Ig Light Chain
IL: Interleukine
IP : Inositol Phosphate
INF- γ : Interféron γ
IRTA : Immuno-Receptor-Translocation-Associated
ITAM : Immunoreceptor-Tyrosine based Activation Motif
ITIM: Immunoreceptor-Tyrosine based Inhibition Motif
ITP: Purpura thrombocytopénique idiopathique
IVIG: intraveineuse d'IgG
kb : Kilobases
kD : KiloDalton
KIR : Killer Inhibitory Receptor
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LLC-B : Leucémies Lymphoïdes Chroniques B
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LMNH : Lymphome Malin Non Hodgkinien
LPS: Lipopolysaccharide
MAP:Mmitogen-activated protein
MCP: Mort cellulaire programmée
MM : Myélome Multiple
MOMP : mitochondria outer membrane permeabilisation
NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
NK : Natural Killer
MPT : mitochondrial permeability transition pore
PARP: Poly ADP ribose polymerase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PH : Plekstrin Homology Domain
PI3K : PI3 Kinase

PKC : Protein Kinase C
PTB : Phosphotyrosine-Binding domain
RB : Rétinoblastome
RAG : Recombinaison Activating Genes
REAL : Revised European American Lymphoma
ROS: Reactive oxygen species
RSS: Recombination Signal Sequence
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SHIP : Src Homology domain Inositol Phosphatase
SHP : Src homology Phosphatase
SVF : Sérum de veau foetal
TCR : T Cell Receptor
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TNF: Tumor Necrosis Factor
VDAC: canal anionique voltage-dépendant
WHO: World Health Organization