

Contrat doctoral – ED Galilée

Titre du sujet : Etude du trafic endosomal du BCR dans les lymphocytes B de Leucémie Lymphoïde Chronique : analyse de l'hétérogénéité de réponse au BCR

- Unité de recherche : UMR 1349 INSERM-Université Sorbonne Paris Nord « Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B » (SIMHEL), UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 BOBIGNY
- Discipline : Immunologie-Oncohématologie
- Direction de thèse : Nadine VARIN-BLANK, DR INSERM / Claudine IRLLES, MCF Université Sorbonne Paris Nord UMR 1349,
- Contact : Email: nadine.varin@inserm.fr; claudineliliane.irlles@univ-paris13.fr
Téléphone : 01 48 38 77 72 ; 01 48 30 88 58
- Domaine de recherche : immuno-oncologie
- Mots clés : Lymphocyte B, leucémie, BCR, endosomes

Sujet de thèse :

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), caractérisée par une accumulation de lymphocytes B CD5⁺, est la leucémie la plus fréquente chez les personnes âgées. Les patients présentent une forte hétérogénéité biologique avec une évolution clinique très variable ; la plupart des patients sont asymptomatiques (indolents) pendant des années tandis que d'autres progressent et nécessitent une thérapie. La signalisation à travers le récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR) a un rôle central dans la pathogénèse de la LLC. En effet, la réponse au BCR varie entre les sous-classes de patients et est associée au pronostic ^{1,2}.

Le projet proposé s'inscrit dans l'étude de la signalisation et du trafic du BCR dans les cellules B de LLC, notamment dans les sous-groupes de patients indolents/progressifs et dans l'analyse de l'hétérogénéité de la réponse au BCR. L'expression du BCR est très diminuée à la membrane des lymphocytes B de LLC avec augmentation de l'internalisation et de l'accumulation dans des endosomes acidifiés ³. En revanche, les cellules gardent une capacité intacte à l'apprêtement et une présentation d'antigènes autologues comparable à celle des lymphocytes B sains mesurée par la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ⁴. Le trafic endosomal du BCR dans le contexte de la LLC reste très peu étudié. Une protéine clé impliquée dans la signalisation, le trafic endosomal et l'apprêtement antigénique est l'aminopeptidase régulée par l'insuline (IRAP). Son transport endosomal-membranaire est régulé par des signaux extracellulaires spécifiques au type de cellule. Dans des cellules dendritiques, IRAP est ancrée à la membrane des endosomes et régule leur maturation ⁵. De plus, son activité enzymatique intra-endosomale est essentielle à la présentation antigénique. Dans les lymphocytes B, la fonction de IRAP reste inconnue. Les résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent une altération du trafic endosomal de IRAP dans les lignées de lymphocytes B leucémiques en comparaison avec des cellules saines. Dans ce contexte, **l'objectif de ce projet de thèse consiste à caractériser les voies du trafic intracellulaire et la signalisation du BCR dans les lymphocytes B de LLC dans le cadre de l'hétérogénéité de réponse à la stimulation antigénique.**

Pour cela, nous étudierons le trafic endo-lysosomal et les voies de signalisation du BCR dans des lymphocytes B de LLC de patients classés en répondeurs ou non répondeurs à la stimulation du BCR (indolents/progressifs) et de donneurs sains. L'activation du BCR par l'antigène induit son internalisation

et son trafic est couplé à des voies endosomales: 1) de signalisation intracellulaire, 2) de recyclage/stockage, 3) de production d'exosomes et 3) de dégradation et présentation antigénique.

Dans un premier volet, suite à une activation du BCR avec un anticorps anti-IgM F(ab)'2, comme antigène, nous identifierons le type de vésicules et leur maturation vers des endosomes de présentation antigénique en utilisant des marqueurs spécifiques du trafic endo-lysosomal-compartiment CMH et de la molécule IRAP par microscopie confocale (Centre de Recherche sur l'Inflammation, Faculté de Médecine Bichat). Ces analyses seront couplées à un indicateur pHrodo Red couplé à l'anticorps anti-IgM F(ab)'2 pour permettre de distinguer les différentes étapes de la voie endocytaire, depuis les endosomes précoces jusqu'à la formation des lysosomes. L'augmentation du signal fluorescent à mesure que le pH diminue sera utilisée pour suivre la progression dans la voie endocytaire. Ces analyses seront confirmées par une approche biochimique de co-immunoprécipitation et de fractionnement cellulaire ainsi que par cytométrie en flux.

Dans un deuxième volet, nous analyserons également les niveaux d'expression et le profil d'activation des kinases et phosphatases en aval du BCR dans les lymphocytes B sains et de LLC indolents/progressifs par des approches de cytométrie en flux multiparamétrique (phosphoflow), de biochimie (Western Blot) et un dosage des cytokines et chimiokines sécrétées sera réalisé.

Dans un troisième volet, nous étudierons la synapse immunologique B-T entre les cellules B de donneurs sains ou de patients LLC indolents/progressifs pulsées avec des superantigènes (SEA/SEB/SEE) avec des lymphocytes T CD4+ et CD8+ autologues. Nous utiliserons les techniques de microscopie confocale et de cytométrie par ImageStream (plateforme Imag'ic, Institut Cochin).

Le projet sera mené dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Loredana Saveanu du LabEx Infibrex (Centre de Recherche sur l'Inflammation, Faculté de Médecine Bichat, INSERM U1149).

1. Meijers, R. W. J. *et al.* Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia cells to B-cell receptor stimulation is associated with low expression of regulatory molecules of the nuclear factor- κ B pathway. *Haematologica* **105**, 182–192 (2020).
2. Le Roy, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **120**, 356–365 (2012).
3. Coulter, E. M. *et al.* and evidence for uncoupling of B-cell receptor internalization and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **103**, 497–505 (2018).
4. Os, A. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. *Cell Rep* **4**, 566–577 (2013).
5. Weimershaus, M. *et al.* IRAP Endosomes Control Phagosomal Maturation in Dendritic Cells. *Front Cell Dev Biol* **8**, 585713 (2020).