



HAL
open science

**Étude des mécanismes de survie des cellules lymphoïdes
B malignes : 1- Rôle de l'enzyme de déubiquitination
USP14 : 2- Effet du fingolimod dans la mort
indépendante des caspases**

Nicholas Dubois

► **To cite this version:**

Nicholas Dubois. Étude des mécanismes de survie des cellules lymphoïdes B malignes : 1- Rôle de l'enzyme de déubiquitination USP14 : 2- Effet du fingolimod dans la mort indépendante des caspases. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4132 . tel-01325220

HAL Id: tel-01325220

<https://theses.hal.science/tel-01325220>

Submitted on 4 Jul 2017

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 NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS
UFR SCIENCES

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Pour obtenir le titre de Docteur en Sciences
Mention interactions moléculaire et cellulaires

Présentée et soutenue par

Nicholas Dubois

Etude des mécanismes de survie des cellules lymphoïdes B malignes:

1- Rôle de l'enzyme de déubiquitination USP14

2- Effet du fingolimod dans la mort indépendante des caspases

Directeur de thèse Marcel Deckert

Composition du jury

Dr Ricci Jean-Erhland, président du jury

Dr Varin-Blank Nadine, rapporteur

Dr Dubreuil Patrice, rapporteur

Dr Deckert Marcel, directeur de thèse

Remerciements

A toute l'équipe MicroCAN, merci de m'avoir accueilli parmi vous pour ces quatre années de thèse. Grâce à vous ces années furent les meilleures qui soient.

Merci à Anaïs, Rania, Moez et Christophe pour leur joyeuse camaraderie et leur disponibilité lorsque j'avais besoin d'eux.

Merci à Virginie pour sa compagnie durant ses quatre années et pour m'avoir aidé à développer mes compétences au FACS où j'aurai passé un bon temps de ma thèse !

Merci à Mélanie pour sa bonne humeur, son incroyable disponibilité et son aide précieuse dans mon travail au quotidien.

Merci à Aude, « toi qui détiens la science », pour avoir toujours su répondre à toutes mes questions, même les plus bêtes.

Merci à Emilien D. pour m'avoir accueilli et aider avec bonne humeur sur son projet de thèse.

Merci à Emilien G. et Alix pour toutes nos discussions geeks et pour tout ce qu'on aura fait au labo ou ailleurs. Grâce à vous le quotidien était bien plus drôle !

Merci à Sophie pour m'avoir accueilli dans cette nouvelle équipe, moi, de la leucémie, au sein de toute cette team mélanome.

Merci à Marcel pour m'avoir accueilli comme étudiant de thèse. Tu auras été un encadrant formidable, riche d'enseignement, disponible et toujours prêt à m'aider quand j'en avais besoin.

Merci à Zied pour les sympathiques discussions philosophiques et religieuses que nous avons pu partager. Ta bonne humeur nous a manqué après ton départ.

Merci à toutes les personnes du C3M que j'ai pu croiser durant ces années de thèse. Merci pour votre aide.

Merci à toutes les personnes de l'Archet 1, Mouna, Hanen et Francis pour ces premiers temps de ma thèse passés ensemble. Merci à Fred pour notre collaboration et ses précieux conseils.

Merci à tous mes amis et en particulier Julien, Vanessa, Matthieu, Eugénie, Thomas, Audrey, Philippe, Marc-Olivier, Jérémy, Théo, Marine, Najib, Johanna, Cyrille et Laetitia. Votre amitié est inestimable depuis de nombreuses années et j'espère l'avoir pendant des dizaines d'années encore !

Merci à toute l'équipe de C'est Pas D'Rôle. Votre compagnie m'aura permis de bien me changer les idées quand je craquais un peu.

Merci à mes parents pour m'avoir toujours aidé et soutenu durant ces années qui ont vu pas mal de changements chez moi. Cela n'aura pas été simple tous les jours, mais vous m'avez bien facilité la tâche. Vous êtes pour moi, les meilleurs parents que l'on puisse avoir et vous avez tout mon amour.

Merci à toute ma famille et à mes frères que j'espère avoir toujours près de moi.

Enfin, merci à la plus précieuse d'entre toutes. Lucie, pour m'avoir aimé et supporté pendant ces quatre longues années. Je n'avais pas toujours le moral, mais tu savais me consoler à chaque fois. Toi que j'aime plus que tout, pour avoir partagé mes jours jusqu'à présent et pour devenir bientôt la femme de ma vie. Je t'aime.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	4
I. LES LYMPHOMES NON HODGKINIENS	5
I.A. DEFINITION	5
I.B. EPIDEMIOLOGIE	5
<i>I.B.1 Les facteurs de risques cliniques et environnementaux</i>	<i>5</i>
<i>I.B.2 Les facteurs de risques génétiques</i>	<i>6</i>
I.C. CRITERES DE DIAGNOSTIC ET CLASSIFICATION DES LYMPHOMES NON HODGKINIENS.....	6
<i>I.C.1 Les différents stades des LNH</i>	<i>7</i>
<i>I.C. 2 L'index de pronostique international (IPI)</i>	<i>8</i>
I.D PHYSIOPATHOLOGIE ET ORIGINE CELLULAIRE DES LYMPHOMES NON HODGKINIENS	9
<i>I.D.1 Origine et développement des lymphocytes B normaux.....</i>	<i>9</i>
<i>I.D.2 Différenciation des lymphocytes B dépendante de l'antigène</i>	<i>11</i>
<i>I.D.3 Origine cellulaire des lymphomes non hodgkiniens</i>	<i>13</i>
<i>I.D.4 Rôle du récepteur aux cellules B.....</i>	<i>15</i>
a) Signalisation du BCR dans les lymphocytes normaux	15
b) Signalisation tonique du BCR.....	17
c) Signalisation du BCR dans les lymphomes non hodgkiniens.....	18
1. Le pré-BCR dans les LNH	18
2. Le BCR dans les LNH	20
I.E. TRAITEMENT DES LYMPHOMES NON HODGKINIENS.....	20
II. LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE.....	23
II.A. DEFINITION	23
II.B. EPIDEMIOLOGIE.....	23
II.C. CRITERES DE DIAGNOSTIC.....	24
<i>II.C.1 Les classifications de Rai et Binet</i>	<i>25</i>
a) La classification de Rai	26
b) La classification de Binet.....	26
<i>II.C.2. Critères biologiques</i>	<i>26</i>
a) Temps de doublement des lymphocytes (TDL).....	26
b) Les marqueurs sériques classiques	27
c) Infiltration médullaire et aspects morphologiques.....	27
<i>II.C.3. Nouveaux facteurs de pronostic.....</i>	<i>27</i>
a) Altérations génétiques.....	27
b) Nouvelles altérations génétiques	29
c) Valeur pronostique du statut mutationnel des Immunoglobulines.....	30
d) CD38	31
e) ZAP-70.....	32
f) LPL/ADAM29	32
g) Autres facteurs pronostiques.....	33
II.D. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE.....	33

<i>I.D.1. Signalisation issue du BCR dans la LLC</i>	33
a) Signalisation du BCR dans la leucémie lymphoïde chronique.....	33
b) Expression de SYK et ZAP-70 dans la leucémie lymphoïde chronique.....	34
<i>II.D.2. Rôle du microenvironnement</i>	35
a) Cellules stromales.....	36
b) Les cellules « Nurse-like ».....	37
c) Les lymphocytes T.....	37
d) Les facteurs solubles et autres récepteurs.....	38
e) La prolifération cellulaire dans la LLC.....	39
<i>II.D.3. Le défaut d'apoptose dans la LLC</i>	40
II.E. TRAITEMENT DE LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE	41
<i>II.E.1 Traitement standard</i>	41
<i>II.E.2 La transplantation de cellules souches</i>	42
<i>II.E.3 Les nouveaux agents anti-cancéreux pour la LLC</i>	42
III. LES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE	44
III.A. L'APOPTOSE.....	44
III.B. L'AUTOPHAGIE.....	48
III.C. LA NECROSE CELLULAIRE.....	50
III.D. LA MORT INDEPENDANTE DES CASPASES.....	53
III.E. LES AUTRES TYPES DE MORT CELLULAIRE.....	54
IV. LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME	56
IV.A. L'UBIQUITINE.....	56
<i>IV.A.1. Caractérisation de l'ubiquitine</i>	56
a) Généralités.....	56
b) Activation et conjugaison de l'ubiquitine.....	57
<i>IV.A.2. Les fonctions de l'ubiquitination</i>	58
IV.B. LES PROTEINES UBIQUITIN-LIKE (UBL).....	63
IV.C. LES ENZYMES DE L'UBIQUITINATION.....	64
<i>IV.C.1. Les enzymes d'activation de l'ubiquitine (E1)</i>	64
<i>IV.C.2. Les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2)</i>	64
<i>IV.C.3. Les enzymes ubiquitine-ligases (E3)</i>	64
<i>IV.C.4. L'activité E4</i>	66
IV.D. LES ENZYMES DE DEUBIQUITINATION.....	66
<i>IV.D.1. Les protéases à domaine Ubiquitine C-terminal Hydrolase (UCH)</i>	67
<i>IV.D.2. Les protéases à domaine Ubiquitine -Spécifique (USP)</i>	67
<i>IV.D.3. Les protéases à domaine Ovarian Tumor (OTU)</i>	69
<i>IV.D.4. Les protéases à domaine Machado-Joseph Disease (MJD)</i>	69
<i>IV.D.5. Les protéases à domaine JAMM/MPN+</i>	69
IV.E. LE PROTEASOME.....	69
<i>IV.E.1 Le protéasome 20S</i>	70
<i>IV.E.2 Le protéasome 19S</i>	71
<i>IV.E.3 Les enzymes de déubiquitination liées au protéasome</i>	71
V. LE PROTEASOME ET LES ENZYMES DE DEUBIQUITINATION DANS LES CANCERS	73
V.A. LE PROTEASOME COMME CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES CANCERS.....	73

V.B. LES ENZYMES DE DEUBIQUITINATION COMME CIBLES THERAPEUTIQUES DANS LES CANCERS.....	74
V.B.1 Les enzymes de déubiquitination mutées dans les cancers.....	74
V.B.2 Les enzymes de déubiquitination dans la régulation du cycle cellulaire	75
V.B.3 Les enzymes de déubiquitination dans la régulation de la chromatine et des dommages à l'ADN.....	75
V.B.4 Les enzymes de déubiquitination dans les voies de signalisation	76
a) La signalisation p53.....	77
b) La signalisation NF-κB	78
c) La signalisation Wnt.....	79
d) La signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases	79
V.B.5 Les enzymes de déubiquitination dans l'apoptose.....	79
OBJECTIFS	81
RÉSULTATS	83
I. ARTICLE : THE DEUBIQUITINATING ENZYME USP14 CONTROLS MCL-1 EXPRESSION AND LYMPHOMA CELL SURVIVAL DOWNSTREAM B CELL ANTIGEN RECEPTOR AND STROMAL PROTECTIVE SIGNALS	83
<i>Résumé</i>	83
<i>Article</i>	84
<i>Discussion</i>	120
II. ARTICLE : FTY720 INDUCES DRP1-DEPENDENT REGULATED NECROSIS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA.....	127
<i>Résumé</i>	127
<i>Article</i>	128
<i>Discussion</i>	161
DISCUSSION GENERALE	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169
ANNEXES	202
ANNEXE I : PROFILS COMPLETS DE DUB REGULEE PAR LE BCR.....	202
ANNEXE II : ACTIN CYTOFRET, A NOVEL FRET FLOW CYTOMETRY METHOD FOR DETECTION OF ACTIN DYNAMICS IN RESTING AND ACTIVATED T CELL	204

Liste des abréviations

B-ALL : B cell acute lymphoblastic leukemia ; leucémie lymphoblastique aiguë dérivée des cellules B

BCR : B cell receptor ; récepteur des cellules B

BMSC : Bone marrow stromal cell ; cellule stromale de la moelle épinière

CDF : Cellules dendritiques folliculaires

CICD : Caspase-independent cell death ; mort indépendante des caspases

CLP : Common lymphoid progenitor ; précurseur lymphoïde commun

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

DD : Death domain ; domaine de mort

DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma ; lymphome diffus à grandes cellules B

DUB : Deubiquitinating enzyme ; enzyme de déubiquitination ou déubiquitinase

E1 : Enzyme d'activation de l'ubiquitine

E2 : Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine

E3 : Enzyme ubiquitine-ligase

FLIPI : Index de pronostique international lymphome folliculaire

HECT : Homologous with E6-associated protein C-terminus

HMS : Hypermutation somatique

HSC : Hematopoietic stem cell ; cellule souche hématopoïétique

Ig : Immunoglobuline

IgH : Immunoglobulin heavy chain ; chaîne lourde des immunoglobulines

IgL : Immunoglobulin light chain ; chaîne légère des immunoglobulines

IgVH : Immunoglobulin variable region of heavy chain ; région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines

IPI : Index de pronostique international

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMP : Lysosomal membrane permeabilization ; perméabilisation des membranes lysosomales

LNH : Lymphome non hodgkinien

LPL : Lipoprotéine lipase

MALT : Mucosa-associated lymphoid tissue

MDR : Région minimale de délétion

MJD : Protéase à domaine Machado-Joseph Disease

MOMP : Mitochondrial outer membrane permeabilization ; perméabilisation de la membrane plasmique mitochondriale

NLC : Nurse-like cell ; cellule nurse-like

OTU : Protéase à domaine Ovarian Tumor

PEST : Domaine proline (P), glutamate (E), serine (S), et thréonine (T)

PMP : Progéniteur multipotent

PTCP : Permeability transition pore complex

RE : Réticulum endoplasmique

REAL : Revised European and American Classification of Lymphoid Neoplasms

RING : Really interesting new gene domain

ROS : Reactive oxygene species ; dérivés réactifs de l'oxygène

SH2 : Tandem SRC homology 2

SLL : Small lymphocytic lymphoma ; lymphome lymphocytaire à petites cellules

SNP : Single-nucleotide polymorphism ; polymorphisme d'un seul nucléotide

TCR : T cell receptor ; récepteur aux cellules T

TDL : Temps de doublement des lymphocytes

UBD : Ubiquitin binding domain

UBL : Ubiquitin-like protein

UCH : Protéase à domaine ubiquitine C-terminal hydrolase

UPR : Unfolded protein response ; réponse aux protéines non repliées

UPS : Ubiquitin-proteasome system ; système ubiquitine-protéasome

USP : Ubiquitin-Specific Proteases ; protéase à domaine ubiquitine -spécifique

WHO : World Health Organization

INTRODUCTION

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) sont de plus en plus fréquents et représentent aujourd'hui le cinquième type de cancer au monde. Leur incidence est en constante augmentation et ces pathologies constituent un véritable problème de santé publique. Les LNH regroupent un panel hétérogène de pathologies originaires de cellules lymphatiques. Parmi les LNH à cellules B matures, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) constitue la forme de leucémie de l'adulte la plus fréquente en occident. Cette pathologie est très hétérogène puisque certains patients n'ont jamais besoin de traitement, alors que d'autres nécessitent une intervention thérapeutique. Une caractéristique majeure des cellules de LLC est leur résistance accrue à l'apoptose physiologique. Cette résistance est le résultat d'une combinaison de facteurs intrinsèques à la cellule, et de facteurs extrinsèques liés au microenvironnement des cellules leucémiques. Au cours de ces dernières années de nombreux travaux ont permis une meilleure compréhension de cette pathologie et ont mis en avant les rôles clés des interactions du microenvironnement, de la signalisation issue du récepteur de l'antigène (le BCR) qui joue un rôle majeur dans le développement des LNH et l'émergence de l'importance des protéines anti-apoptotique de la famille BCL-2 et plus particulièrement de MCL-1.

Malgré tous les progrès de ces dernières années, la LLC reste à ce jour une maladie incurable. De nouvelles approches thérapeutiques et de nouveaux agents pharmacologiques sont constamment éprouvés lors d'essais cliniques. Plus récemment ont été mis en exergue les dysfonctionnements du système ubiquitine-protéasome dans les cellules cancéreuses. Le ciblage du système ubiquitine-protéasome (UPS) constitue une nouvelle approche dans le traitement des hémopathies malignes. La protéine MCL-1, dont la demi-vie est très courte, est fortement régulée par ce système de dégradation des protéines au sein de la cellule. Une première partie de ce travail de thèse a été de déterminer quelles pouvaient être les enzymes de déubiquitination (DUBs) impliquées dans la stabilisation de MCL-1, lui permettant d'échapper à la destruction par le système ubiquitine-protéasome et favorisant de fait les phénomènes de survie des LLC.

Les résistances aux thérapies actuelles sont fréquentes dans la LLC, c'est pourquoi il est nécessaire de découvrir des alternatives à ces traitements. Ainsi, dans des études récentes, le FTY720 a montré un effet cytotoxique dans des hémopathies sans toutefois que son mécanisme d'action soit clairement expliqué. Une deuxième partie de ce travail de thèse s'est donc porté sur la caractérisation de la mort induite par le FTY720, un analogue de la sphingosine, utilisé comme immunosuppresseur dans la sclérose en plaques.

I. Les lymphomes non hodgkiniens

I.A. Définition

Les lymphomes sont des tumeurs solides du système immunitaire développées à partir des tissus lymphoïdes. Les lymphomes Hodgkiniens comptent pour 10% de la totalité des lymphomes et les 90 % restant sont classifiés comme des lymphomes non hodgkiniens (LNH). Les LNH sont des lymphomes développés à partir de cellules B (85% des cas) ou T (15% des cas). Le pronostic global est très variable selon les différentes formes histologiques. Ces formes peuvent être classées selon des progressions indolentes ou agressives (Shankland et al., 2012; Young and Staudt, 2013).

Les lymphomes de haut grade ou agressifs, de par leurs symptômes, vont nécessiter l'instauration d'un traitement immédiat du patient. Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) représentent environ 60 % et les lymphomes du manteau environ 20% des formes agressives. Les lymphomes agressifs constituent 50 à 60% des LNH.

Dans les lymphomes de bas grade ou indolents, dont le lymphome folliculaire constitue 80% des cas, un traitement n'est pas initialement nécessaire. L'évolution de la pathologie va s'étaler dans le temps avant de nécessiter des soins. Un lymphome indolent peut se transformer en une forme agressive (15 à 40% de chances selon l'histologie initiale). Parmi les formes indolentes, la leucémie lymphoïde chronique constitue la forme de leucémie la plus fréquente chez l'adulte.

I.B. Épidémiologie

Les LNH couvrent un panel de plus de 30 pathologies différentes, mais toutes d'origine lymphatique. En France, les LNH représentent 3 % de l'ensemble des cancers et se situent au 7^{ème} rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et au 6^{ème} rang chez la femme. 3 700 décès annuels, dont 54 % chez l'homme, leur sont imputables, ce qui représente 2,5 % des décès par cancer (Institut de veille sanitaire, 2013).

Deux patients sur trois ont plus de 60 ans lors du diagnostic de la pathologie. La fréquence des différents sous-types de LNH varie considérablement d'une région géographique à l'autre. Par exemple, les lymphomes T de l'adulte avec infection par le virus T-lymphotrope humain de type 1 sont plus fréquents en Asie de l'est alors que dans les autres régions, ce sont les lymphomes T ou NK (Natural Killer) associés à une infection par le virus Epstein-Barr qui prédominent. De même, les lymphomes folliculaires sont plus fréquents en Europe de l'ouest et en Amérique du nord. A l'inverse, les DLBCL se retrouvent à une fréquence commune équivalente dans le monde entier. L'incidence est en constante augmentation dans plusieurs régions du globe dont l'Europe (Shankland et al., 2012).

I.B.1 Les facteurs de risques cliniques et environnementaux

Les facteurs de risques entraînant le développement d'un LNH les mieux caractérisés sont l'immunosuppression, la transplantation d'organes (en particulier de cellules souches accompagnées de

fortes doses de chimiothérapie) ou les transplantations entraînant des syndromes d'immunodéficiences ou de maladies auto-immunes. Les virus capables d'induire des immunodéficiences augmentent le risque de déclencher des LNH. C'est le cas par exemple du virus T-lymphotrope humain de type 1, du virus d'Epstein-Barr, du virus de l'hépatite C et des infections par *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* ou *Chlamydia psittaci* (Zhang et al., 2011b).

Les facteurs environnementaux et les modes de vie sont capables d'influencer les risques de développer un LNH spécifique. Par exemple, la consommation de cigarettes favorise les risques de développer un lymphome folliculaire. La consommation d'alcool apparaît comme capable de diminuer les risques de développer un LNH. L'obésité augmente les risques de contracter un DLBCL. L'exposition aux solvants et certains produits chimiques augmente l'incidence des LNH. L'impact de l'exposition aux U.V. reste quant à elle controversée (Zhang et al., 2011b).

I.B.2 Les facteurs de risques génétiques

De nombreuses études démontrent que des polymorphismes génétiques augmentent les risques de développer des LNH. Ainsi, un polymorphisme spécifique des gènes *Th1* et *Th2* augmente les chances de déclarer des lymphomes B. Des variations génétiques régionales dans les gènes TLR10, TLR1 et TLR6 augmentent les risques de LNH (Zhang et al., 2011b). Une vaste étude portant sur 1 253 polymorphismes génétiques a révélé que le polymorphisme des gènes TRAF1, RIPK3, BAT2, TLR6, MAP3K5, DUSP2, CREB1, B3GNT3, SELPLG, LSP1, FGG et ITGB3 peuvent être reliés à la tumorigénèse des LNH (Cerhan et al., 2007). Des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs) des gènes *GPX1*, *NOS2A*, *SOD2*, *AKR1A1*, et *CYBA* sont reliés aux risques de LNH (Lan et al., 2007).

Les translocations chromosomiques t(3,22) retrouvées dans les DLBCL et t(14,18) retrouvées dans les lymphomes folliculaires sont des marqueurs des LNH. Des aberrations chromosomiques dans les voies de réparations de l'ADN double brin et du métabolisme du carbone sont des facteurs de risque pour les LNH (Zhang et al., 2011b).

I.C. Critères de diagnostic et classification des lymphomes non hodgkiniens

Les LNH présentent plus d'une trentaine de sous-types différents (voir tableau 1). Ces différents lymphomes pourraient provenir d'une expansion clonale maligne des lymphocytes à différents stades du processus de développement des cellules lymphatiques. Les anciennes classifications se basaient sur la morphologie des LNH. Mais les récentes avancées dans la compréhension des différentes étapes du développement lymphocytaire ont permis de mieux cerner l'origine de ces pathologies et ont dû entrer en compte dans la classification des LNH. Ainsi, le groupe international d'étude des lymphomes a établi la REAL (Revised European and American Classification of Lymphoid Neoplasms), régulièrement mise à jour par la World Health Organization. Elle tient compte des caractéristiques cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et génétiques. Chaque LNH possède des caractéristiques différentes, mais elles peuvent être regroupées en lymphomes de bas ou de haut grade selon leur indolence ou leur agressivité (Hennessy et al., 2004; Shankland et al., 2012).

Diseases	
B-cell lymphomas	
Precursor B cell	Precursor B-cell lymphoblastic leukaemia or lymphoma
Mature B cell	Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma; lymphoplasmacytic lymphoma; splenic marginal-zone lymphoma; extranodal marginal-zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue; nodal marginal-zone B-cell lymphoma; follicular lymphoma; mantle-cell lymphoma; diffuse large B-cell lymphoma; Burkitt's lymphoma
B-cell proliferations of uncertain malignant potential	Lymphomatoid granulomatosis; post-transplantation lymphoproliferative disorders (polymorphic)
T-cell and NK-cell lymphomas	
Precursor T cell	Precursor T-cell lymphoblastic leukaemia or lymphoma
Extranodal mature T cell and NK cell	Mycosis fungoides; cutaneous anaplastic large-cell lymphoma; extranodal NK-cell or T-cell lymphoma; enteropathy-type lymphoma; hepatosplenic lymphoma; subcutaneous panniculitis-like lymphoma; primary cutaneous CD8-positive lymphoma; primary cutaneous γ/δ T-cell lymphoma; primary cutaneous CD4-positive lymphoma
Nodal mature T cell and NK cell	Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified; angioimmunoblastic lymphoma; anaplastic large-cell ALK-positive lymphoma; anaplastic large-cell ALK-negative lymphoma; adult T-cell leukaemia/lymphoma

NK=natural killer.

Tableau 1 : Sous-type de lymphomes non hodgkiniens d'après la classification WHO 2008. (Tirée de Shankland et al., 2012)

I.C.1 Les différents stades des LNH

Les LNH peuvent être classés en quatre stades décrits par Ann Arbor (tableau 2) durant l'évolution de la pathologie et vont déterminer sa gravité.

Definition	
Principal stages	
I	Involvement of one lymph node or one extranodal organ or site (IE)
II	Involvement of two or more lymph node regions on the same side of the diaphragm, or localised involvement of an extranodal site or organ (IIE) and one or more lymph node regions on the same side of the diaphragm
III	Involvement of lymph node regions on both sides of the diaphragm, which might be accompanied by localised involvement of an extranodal organ or site (IIIE) or spleen (IIIS) or both (IIISE); the spleen is regarded as nodal
IV	Diffuse or disseminated involvement of one or more distant extranodal organs with or without associated lymph node involvement
Modifiers	
A	Absence of B symptoms (listed below)
B	Temperature $>38^{\circ}\text{C}$, night sweats, and weight loss of greater than 10% of bodyweight in the 6 months preceding admission are defined as systemic symptoms

Tableau 2 : Système de stades d'Ann Arbor. (Tirée de Shankland et al., 2012)

Le stade I implique une seule région ganglionnaire, ou un organe unique ou un unique site extra-lymphatique atteint. Le Stade II de la maladie correspond à deux ou plusieurs ganglions lymphatiques atteints mais se situant du même côté du diaphragme, ou dont la localisation sur un organe ou un site extra-ganglionnaire et une ou plusieurs régions ganglionnaires se situe du même côté du diaphragme. La phase III implique des régions ganglionnaires atteintes des deux côtés du diaphragme avec, éventuellement, une atteinte de la rate ou d'un organe extra-ganglionnaire, ou des deux. Le stade IV de la maladie est caractérisé par une atteinte diffuse de un ou plusieurs sites extra-nodaux, tel que le foie ou la moelle osseuse. La présence de symptômes généralisés tels qu'une fièvre supérieure à 38 ° C, des sueurs nocturnes et une perte de plus de 10% du poids corporel au cours des 6 mois précédant le diagnostic, peut accompagner chacun de ses stades.

I.C. 2 L'index de pronostique international (IPI)

L'index de pronostique international (IPI) est le modèle de pronostique le plus utilisé pour les LNH. Cet index s'intéresse à différentes caractéristiques cliniques lors du diagnostic d'un LNH :

- âge du patient (≤ 60 ans vs > 60 ans)
- concentration de lactate déshydrogénase (normale vs anormale)
- l'état de santé du patient à travers le statut de performance du Eastern Cooperative Oncology Group (< 2 vs ≥ 2)
- stade Ann Arbor (I/II vs III/IV)
- le nombre de sites extra-ganglionnaires atteints (\leq un vs $>$ un).

A partir de là, quatre groupes de risques sont déterminés : risque faible (zéro à une caractéristique clinique), risque intermédiaire bas (deux caractéristiques), risque intermédiaire haut (trois caractéristiques) et risque élevé (quatre à cinq caractéristiques).

Appliqués à 2 031 patients, ces groupes de risque ont montré une espérance de vie à 5 ans de 73%, 51%, 43% et 26%, respectivement. L'âge est un important marqueur rapidement associé à un mauvais pronostic. Cependant, les patients âgés qui sont en mesure de recevoir une chimiothérapie ont des taux de survie similaire aux patients plus jeunes (Hennessy et al., 2004).

La grande hétérogénéité biologique et l'étude de l'expression des gènes des DLBCL a permis d'identifier deux grands sous-groupes dans cette pathologie : ceux dont l'origine vient du centre germinatif, connus sous le nom de lymphome B du centre germinatif (typiquement CD10 + et BCL6 +) et ceux provenant de cellules ressemblant à des cellules B activées (typiquement IRF4 / MUM1 +/- et CD138 +). Cette distinction clinique s'est avérée pertinente, car la survie sur 5 ans est de 76% pour le sous-groupe du centre germinatif contre 16% pour le groupe à cellules B activées (Alizadeh et al., 2000). L'évolution des traitements rend cette question toujours d'actualité car une évaluation portant sur 153 patients traités en thérapie R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicine et prednisolone) a montré chez les deux sous-groupes une augmentation de la survie générale par rapport aux témoins historiques traités avec un traitement CHOP (avant l'avènement du rituximab), mais le sous-groupe du centre germinatif présentait une survie globale de 86% sur 3 ans alors que le sous-groupe à

cellules B activées présentait 68% de survie (Lenz et al., 2008). Ces caractéristiques font que l'IPI pour cette pathologie est toujours en court de validation.

L'IPI est moins utile dans le lymphome folliculaire. En effet, beaucoup moins de patients présentent de hauts risques pour cette pathologie, Ainsi un index pronostique international de l'évolution du lymphome folliculaire (FLIPI) a été élaboré. Trois de ses cinq variables pronostiques sont identiques à ceux de l'IPI : l'âge, le stade Ann Arbor, et la concentration dans le sérum de lactate déshydrogénase. Les deux autres variables sont le taux d'hémoglobine (<12 g/L vs ≥12 g/L) et le nombre de sites ganglionnaires impliqués (>4 vs ≤4). Les patients sont ainsi répartis dans l'un des trois groupes de pronostiques : faible (de zéro à une variable), intermédiaire (deux variables) ou élevé (trois ou plus). Ces groupes ont une espérance de vie sur 10 ans de 71%, 51% et 36% respectivement. Le FLIPI doit encore être validé depuis l'arrivée du rituximab (Hennessy et al., 2004; Shankland et al., 2012).

I.D Physiopathologie et origine cellulaire des lymphomes non hodgkiniens

Les LNH sont un groupe très hétérogène de pathologies comme le montre leur classification. Pour comprendre par quels mécanismes les LNH se développent, il est nécessaire de comprendre les étapes de développement d'une cellule B normale. En effet, c'est lors de ses étapes de maturation que vont se rencontrer des évènements oncogéniques qui vont conduire à la formation des LNH.

I.D.1 Origine et développement des lymphocytes B normaux

Toutes les cellules du système immunitaire se différencient à partir d'un précurseur commun : la cellule souche hématopoïétique (HSC) (Figure 1). La HSC se différencie en un progéniteur multipotent (PMP) qui a perdu la capacité d'autorenouvellement de la HSC mais possède le potentiel de se différencier en plusieurs lignages. Une partie des PMP va engendrer les précurseurs lymphoïdes communs (CLP) à l'origine des lymphocytes B (Figure 3), des lymphocytes T, des cellules « Natural killer » et des cellules dendritiques. Le développement précoce des cellules B se déroule dans la moelle osseuse chez l'homme. Il est régulé par l'action concertée de cytokines et par l'expression séquentielle de facteurs de transcription d'une part et l'expression à la surface du récepteur à l'antigène d'autre part (LeBien and Tedder, 2008; Nutt and Kee, 2007).

Un évènement crucial dans la spécification du lignage B est l'expression des facteurs de transcription E2A et EBF1 (early B cell factor 1). Le facteur EBF1, sous le contrôle des E2A (Kee and Murre, 1998) va engager spécifiquement les précurseurs lymphoïdes dans la voie de différenciation des lymphocytes B, pour atteindre un stade pro-B (Figure 1) (Lin and Grosschedl, 1995). Ces facteurs de transcription vont induire l'expression du facteur de transcription PAX5 qui permet le passage au stade pré-B. Ce facteur de transcription permet notamment l'expression de nombreux récepteurs et composants du récepteur aux lymphocytes B (BCR) (Nutt and Kee, 2007).

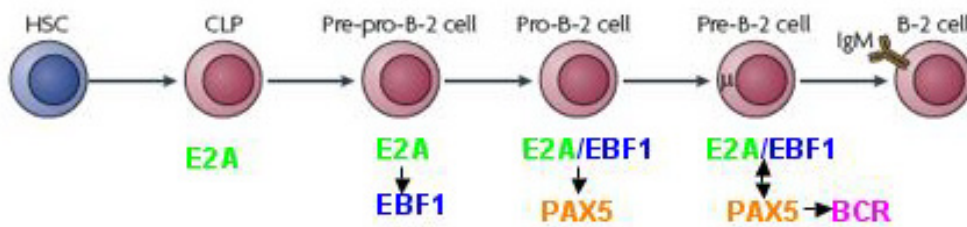


Figure 1 : Etapes de maturation des lymphocytes B. Les stades majeurs du développement B sont représentés avec pour chacun les facteurs de transcription clés impliqués. HSC : cellule souche hématopoïétique ; CLP : précurseur lymphoïde commun ; BCR B cell receptor, récepteur aux lymphocytes B. (Adaptée de Nutt and Kee, 2007).

Aux différents stades du développement et de la différenciation B correspond une structure particulière du BCR, dont les étapes de différenciation sont également dépendantes. Le BCR est formé de 4 sous unités de type immunoglobuline (Ig) : deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Le locus codant pour la chaîne lourde des Ig du BCR est localisé sur le chromosome 14 et subdivisé en gènes codants pour les régions variables (V), diversifiées (D), de jonction (J) et constantes (C) (Figure 2). La chaîne légère est codée à partir soit du gène κ du chromosome 2 soit du gène λ du chromosome 22. Les gènes codants pour la chaîne légère possèdent les régions V, J et C, mais ne possèdent pas de région D. Ces régions sont elles-mêmes divisées en segments séparés par des séquences de recombinaison somatique. Ces segments vont subir des réarrangements (Brack et al., 1978) via deux recombinaisons, les enzymes RAG1 et RAG2 (recombination-activating gene 1 and 2) (Oettinger et al., 1990). De plus, l'enzyme TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) catalyse l'addition aléatoire de nucléotides aux segments de jonction, et ainsi augmente la diversité combinatoire. Chaque chaîne ne comportera alors qu'un seul segment de chaque région (Figure 2). Ces événements de recombinaison vont rythmer les étapes de différenciation des lymphocytes B et sont la marque de son niveau de maturation (Alt, 1986).

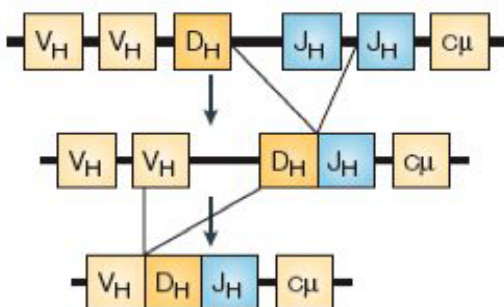


Figure 2 : Recombinaison VDJ des segments des gènes codants pour la région variable de la chaîne lourde des Ig. Les segments des régions codant pour les régions variables (V), diversifiées (D), de jonction (J) et constantes (C) vont subir un réarrangement D_H - J_H suivi du réarrangement V_H - D_H (Tirée de Klein and Dalla-Favera, 2008).

Au sein de la moelle osseuse, les cellules pro-B vont d'abord subir un réarrangement des segments D et J de leurs chaînes lourdes suivi du réarrangement V et DJ (Figure 2). Si ce réarrangement

s'effectue avec succès, les premières chaînes lourdes Ig μ sont exprimées à la surface des cellules pré-B. Elles font partie du complexe pré-BCR. Le pré-BCR est constitué de deux chaînes Ig μ associées à deux pseudos chaînes légères (SLC : surrogate L chain), $\lambda 5$ et VpreB, le tout étant associé aux sous-unités de signalisation Ig α et Ig β du complexe CD79. Alors que le pré-BCR n'est exprimé que transitoirement, il représente un point crucial du développement B (Herzog et al., 2009). La signalisation issue du pré-BCR va permettre une prolifération accrue mais également l'inhibition du réarrangement des régions V et DJ sur l'autre allèle de la chaîne lourde permettant l'exclusion allélique et l'expression à la surface d'un récepteur à spécificité unique. De plus, cette signalisation permet une diminution de l'expression de la SLC, engendrant le réarrangement des gènes de la chaîne légère, et ainsi la différenciation des cellules pré-B en cellules B immatures (Geier and Schlissel, 2006; Herzog et al., 2009).

Ces cellules B immatures vont alors subir une sélection négative. En effet, les cellules B exprimant un BCR capable de reconnaître les antigènes du soi (auto-réactif) vont être éliminées à 75% par apoptose. Toutefois certains lymphocytes B échappent à cette mort prématurée en rééditant à leur surface un nouveau BCR non auto-réactif. D'autres n'ayant qu'une affinité partielle pour l'antigène deviennent anergiques.

Ces lymphocytes B immatures sont dits transitionnels. Ils ne reconnaissent aucun antigène autologue et vont co-exprimer transitoirement les immunoglobulines IgD et IgM membranaires de même spécificité antigénique (Geier and Schlissel, 2006). Ils expriment également la molécule CD23 à leur surface. La majeure partie des lymphocytes B va rejoindre les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires comme la rate, où vont s'accomplir les étapes de différenciation dépendantes des antigènes étrangers (Pillai and Cariappa, 2009).

I.D.2 Différenciation des lymphocytes B dépendante de l'antigène

Les cellules B naïves entrent dans la rate et vont rencontrer un antigène et lui répondre. Ces cellules vont soit directement se développer en cellules sécrétrices d'anticorps au sein des sites extrafolliculaires spécialisés (zone marginale), soit se différencier en cellules formant un centroblaste au sein d'un centre germinatif (Figure 3) (Klein and Dalla-Favera, 2008; Pillai and Cariappa, 2009). La décision des lymphocytes B de se différencier en cellules B de la zone marginale ou d'entrer en prolifération au sein des centres germinatifs dépend : de la rencontre antigénique qui peut être dépendante ou pas du lymphocyte T, de l'affinité du BCR pour l'antigène, mais également d'autres récepteurs comme le BAFF-R (receptor for B cell activating factor), associés à certaines voies de signalisation incluant la voie NF-kB et la voie Notch (Pillai and Cariappa, 2009).

Les follicules nouvellement structurés en follicules secondaires sont dorénavant dotés d'une zone du manteau entourant le centre germinatif lui-même divisé en une zone claire et une zone sombre. L'ensemble étant séparé de la zone extrafolliculaire par la zone marginale (figure 3).

Les centroblastes vont subir une intense prolifération au sein de la zone sombre du centre germinatif (Figure 3) (Allen et al., 2007). Se met alors en place le processus d'hypermutation somatique (HMS) qui mène à l'introduction aléatoire de mutations ponctuelles au sein des gènes codant pour les

régions variables des Ig. Ce processus de HMS est associé à des cassures des brins d'ADN et nécessite l'activité d'une enzyme : l'AID (activation induced cytidine désaminase). Cette enzyme catalyse l'initiation du processus de HMS en enlevant le groupement amine de la cytidine sur l'ADN.

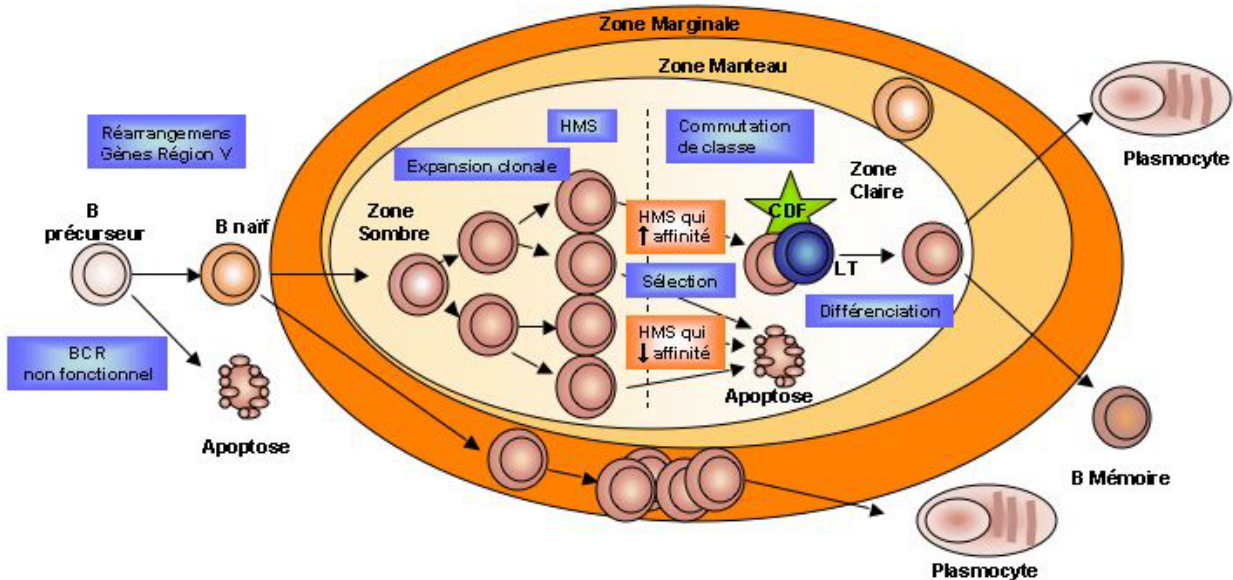


Figure 3 : Différenciation des cellules B au sein du centre germinatif. Les cellules B naïves qui ont reçu un signal antigénique dépendant des lymphocytes T entrent dans les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires où ils établissent des centres germinatifs. Le centre germinatif est séparé en deux zones : la zone sombre, lieu de prolifération intensive et du processus d'hypermutation somatique (HMS). Si le processus d'HMS entraîne des mutations désavantageuses qui diminuent l'affinité du BCR pour l'antigène, les cellules partent en apoptose ; au contraire s'il augmente l'affinité, les cellules sont sélectionnées positivement et passent dans la zone claire où elles entrent en contact avec les lymphocytes T CD4+ et les cellules dendritiques folliculaires (CDF). Une partie des cellules va subir le processus de commutation de classe. Finalement, les cellules se différencient en cellules plasmocytaires ou en cellules B mémoires et quittent le microenvironnement (Adaptée de Klein and Dalla-Favera, 2008; Kuppers et al., 2005).

La plupart de ces mutations sont désavantageuses pour la cellule car elles diminuent l'affinité du BCR pour l'antigène, aboutissant à l'élimination de la cellule par apoptose. Seule une faible proportion de mutations augmente l'affinité du BCR et conduit à sa sélection positive dans la zone claire du centre germinatif. Une partie des centroblastes, ayant subi le processus de HMS, peut migrer dans la zone claire du centre germinatif, on parle alors de centrocyte (Figure 3).

La zone claire du centre germinatif est le site de trois processus développementaux essentiels du lymphocyte B : la sélection des lymphocytes produisant des Ig de haute affinité, le processus de

commutation de classe, et la différenciation des centrocytes en cellules plasmocytaires sécrétrices d'anticorps ou en cellules B mémoires (Figures 3).

Les centroblastes possédant un nouveau BCR vont subir une sélection positive par les lymphocytes T et les cellules dendritiques folliculaires (CDF). En effet, seuls les centrocytes exprimant un BCR modifié présentant une forte affinité pour l'antigène vont survivre (Figure 3). L'engagement du BCR, mais également des molécules de costimulation, CD40, à la surface des cellules B, et du ligand CD154 (CD40L), à la surface du lymphocyte T, induisent l'activation de voies de signalisation essentielles à la survie des centrocytes. Cette étape permet également l'induction du processus de commutation de classe des Ig. Il s'agit d'une recombinaison somatique irréversible par laquelle les cellules B peuvent exprimer d'autres isotypes d'immunoglobulines, possédant d'autres fonctions, et ceci sans altérer la spécificité pour l'antigène. Ce processus de recombinaison de classe nécessite également l'activité de l'enzyme AID (Kuppers et al., 2005).

Les cellules B du centre germinatif se différencient finalement en cellules plasmocytaires sécrétrices d'anticorps IgG, IgA, et IgE, ou en lymphocytes B mémoires et quittent le microenvironnement du centre germinatif (Klein and Dalla-Favera, 2008; Kuppers et al., 2005).

I.D.3 Origine cellulaire des lymphomes non hodgkiniens

Les différentes étapes de la formation des lymphocytes B peuvent connaître des altérations et des perturbations conduisant à l'apparition de LNH. Ainsi, dans les phases précoces du développement de la cellule B, des événements de transformations et de translocations chromosomiques vont aboutir à des défauts du pré-BCR. Ceci peut mener au développement de leucémies lymphoblastiques aiguës dérivées des cellules B (B-ALL) (Iacobucci et al., 2012). Ces cellules B malignes n'ont en effet pas besoin du récepteur à l'IL-7 ou de la signalisation du pré-BCR pour survivre.

De même, à un stade de différenciation précoce, les lymphomes du manteau sont des néoplasies lymphoïdes dont le phénotype aurait pour origine un lymphocyte B arrêté au stade immature. En effet, ces lymphomes se développent dans la zone du manteau des ganglions lymphatiques, mais l'absence d'hypermutations somatiques indique que ces lymphocytes n'ont pas fait l'expérience du centre germinatif (Walsh and Rosenquist, 2005).

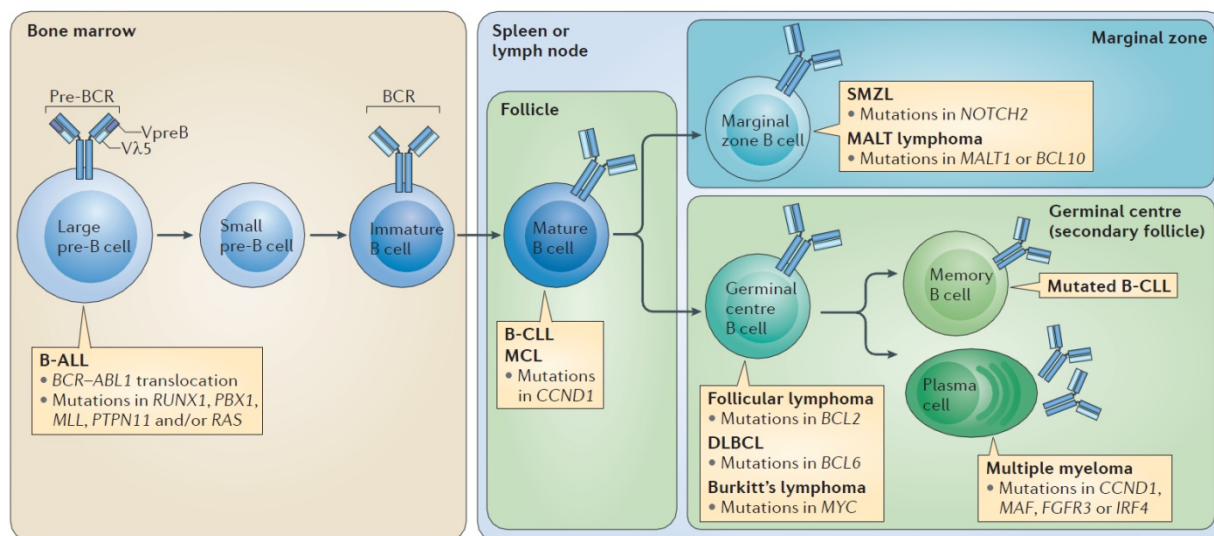


Figure 4 : Apparition de cellules B néoplasiques lors des différentes étapes de la différenciation de la cellule B normale. Les cellules B malignes sont associées aux différentes étapes du développement de la cellule B. Des translocations chromosomiques et des mutations génétiques sont fréquemment impliquées dans l'apparition des cellules B néoplasiques (Tirée de Rickert, 2013).

La majorité des LNH (dont les lymphomes folliculaires, les lymphomes de Burkitt et les DLBCL) sont dérivées du centre germinatif des cellules B (Figure 4) (Allen et al., 2007; Lenz and Staudt, 2010). D'ailleurs, la présence de mutations dans les segments V des gènes des immunoglobulines est un important marqueur des hémopathies malignes dérivées du centre germinatif ou dérivées des cellules B qui en sont sorties, comme c'est le cas dans la leucémie lymphoïde chronique. Les lymphomes folliculaires et les lymphomes B diffus à grandes cellules de type centre germinatif présentent des phénotypes typiques de ce stade de développement. Ils présentent en particulier des hypermutations des régions variables des gènes des Ig. Ils possèdent également des mutations oncogéniques de Bcl-2 et Bcl-6 causées au moment des recombinaisons VDJ des chaînes lourdes et lors du processus d'hypermutation somatique au sein du centre germinatif. Ils expriment à leur surface la metallo-endopeptidase CD10, molécule de surface exprimée par les cellules du centre germinatif (Shaffer et al., 2002).

L'expression de l'enzyme AID peut être préjudiciable et entraîner l'expression d'oncogènes. Par exemple, la translocation de MYC dans le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) va entraîner une expression constitutive de MYC. MYC va contribuer aux événements oncogéniques et au développement des lymphomes B (Lenz and Staudt, 2010).

Les cellules B de la zone marginale se situent à la frontière entre la circulation et les tissus lymphatiques et sont soumises à de nombreux signaux du microenvironnement et aux processus de différenciation par stimulation à l'antigène. Elles sont à l'origine de la majorité des LNH indolents qui progressent dans la rate, tels que les lymphomes de la zone marginale, les lymphomes spléniques de la

zone marginale et des ganglions lymphatiques, ou les lymphomes extra-ganglionnaires comme les lymphomes MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) (Bende et al., 2009).

I.D.4 Rôle du récepteur aux cellules B

a) Signalisation du BCR dans les lymphocytes normaux

Toutes les cellules B normales, et par incidence tous les lymphomes B, possèdent un BCR unique. Le BCR est un immunorécepteur transmembranaire, composé d'un complexe multimérique formé par une immunoglobuline membranaire assurant la spécificité d'interaction avec l'antigène et par un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a /CD79b). Chaque chaîne $Ig\alpha$ ou $Ig\beta$ contient un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif) dans leur queue cytosolique qui permet de relier les signaux extracellulaires à l'activation de voies de signalisation permettant la transduction du signal dans le cytoplasme (Turner et al., 2000).

Chaque chaîne lourde (IgH) et chaîne légère (IgL) des immunoglobulines possède une région variable (V) unique qui va permettre au BCR de reconnaître et lier des antigènes spécifiques. Le BCR est non seulement capable de lier les antigènes extérieurs à la cellule à l'aide des régions variables (V) afin d'induire la transduction du signal, mais aussi de générer un signal tonique initié sans antigènes extérieurs et essentiel à la maturation et à la survie des cellules B (Stevenson et al., 2011).

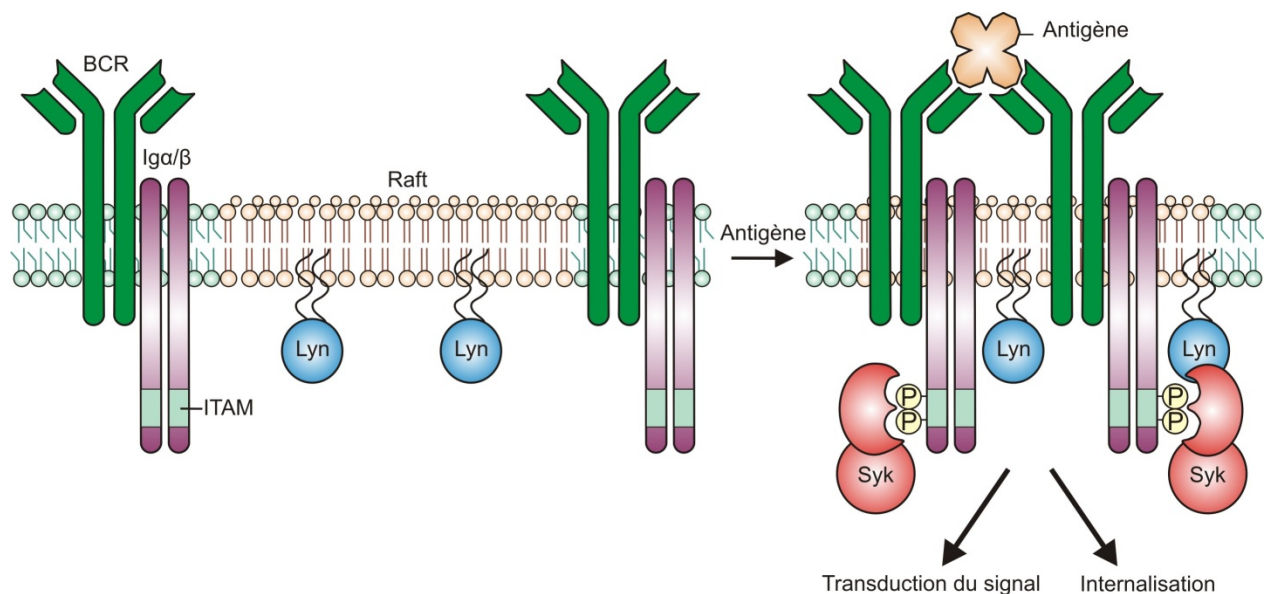


Figure 5 : Activation et agrégation du BCR. La liaison de l'antigène entraîne l'agrégation des récepteurs et permet à la kinase Lyn de s'activer par transphosphorylation et de phosphoryler les motifs ITAM. Syk est alors recrutée via ses domaines SH2, phosphorylée par les kinases Lyn, transphosphorylée par d'autres Syk ou autophosphorylée. (Adaptée de Pierce, 2002)

La fixation d'un antigène va entraîner l'agrégation des récepteurs (Figure 5) et conduire à la phosphorylation des ITAMs par les tyrosines kinases de la famille SRC et plus particulièrement BLK, LYN et FYN. Cette dernière apparaît être la première kinase engagée dans le processus, permettant le recrutement des protéines de la famille SYK et leur activation au niveau des ITAMs di-phosphorylés sur leur domaine SH2 (tandem SRC homology 2).

LYN phosphoryle SYK sur les tyrosines 348 et 352. Ces phosphorylations vont augmenter l'activité de SYK et générer des sites d'accrochage pour les protéines en aval de la signalisation induite par SYK et le BCR (Geahlen, 2009). Par la suite, SYK est capable de s'auto-transphosphoryler sur les tyrosines 525 et 526 en une boucle d'activation pour être complètement activée. Une fois activée, SYK permet l'activation de la Tyrosine Kinase de Bruton (BTK), de BLNK (B cell linker) et de la phospholipase $\text{C}\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$), mais aussi de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) (Figure6). La PLC $\gamma 2$ va permettre le relargage intracellulaire du calcium et l'activation des les protéines kinases C (PKC) dont la PKC β . Cette PKC va phosphoryler de nombreux substrats dont CARD11, un adaptateur clé de la régulation de la signalisation de NF- κ B (Shinohara et al., 2005). La PI3K va permettre la production du second messenger phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) qui va entraîner le recrutement de AKT et mTOR (mammalian target of rapamycin) (Figure6). Cette activation de SYK s'accompagne également d'une activation de la voie des MAPKs (mitogen-activated protein kinases) et RAS avec l'activation de ERK1/2, C-JUN, JNK et p38 MAPK (Figure6) (Bellacosa et al., 1998; Hashimoto et al., 1998; Johnson and Lapadat, 2002; Sekulic et al., 2000). Ces évènements vont réguler la prolifération, la survie et l'apoptose des cellules B en contrôlant la transcription des facteurs NF- κ B et NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Le Roy et al., 2012), mais également en stabilisant l'expression de membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 tels que MCL-1 (Baudot et al., 2009; Longo et al., 2008; Rao et al., 1997; Ruland and Mak, 2003).

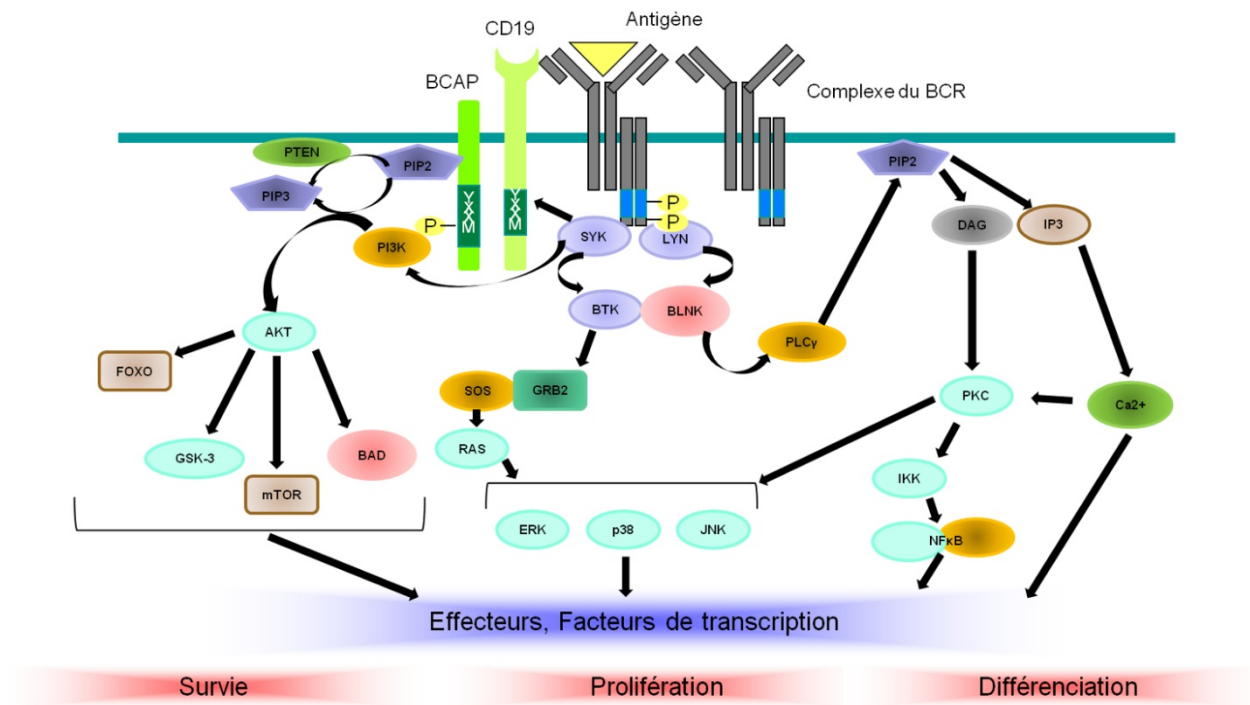


Figure 6 : La signalisation issue du BCR. (Adapté de Choi and Kipps, 2012)

b) Signalisation tonique du BCR

La signalisation tonique du BCR est indépendante de l'antigène. Cette signalisation joue un rôle crucial dans la sélection positive des cellules B immatures et le maintien des cellules B matures (Mocsai et al., 2010). Malgré diverses études, ce mécanisme demeure obscur. Son déclenchement serait issu d'un événement aléatoire entraînant des changements dans la balance entre des régulateurs positifs tel que CD45 et des régulateurs négatifs tel que CD22. CD45 ainsi que d'autres régulateurs positifs interagissent avec le complexe du BCR entraînant l'activation des tyrosines kinases de la famille SRC et la phosphorylation des domaines ITAMs (Monroe, 2006). L'activation complète de SYK par les ITAMs dans ce mécanisme est incomprise car les tyrosines 525 et 526 de la boucle d'auto-transphosphorylation ne sont pas détectées (Carsetti et al., 2009). Un autre modèle suggère que dans les cellules B quiescentes, la GTPase TC21, qui interagit constitutivement avec les motifs ITAMs non phosphorylés, recrute directement la sous-unité catalytique de la PI3K aux ITAMs. Ceci permettrait d'activer la voie PI3K/AKT nécessaire à la survie de la cellule en absence de stimulation du BCR (Delgado et al., 2009). D'anciennes études suggèrent également que lorsqu'il n'est pas exposé à un antigène, le BCR est pré-associé avec des kinases de la famille SRC, mais aussi des tyrosines phosphatases comme SHP1 qui annuleraient la signalisation du BCR, mais toutefois pas en totalité (Wienands et al., 1996). Une étude plus récente apporte une autre explication en suggérant que dans les cellules B quiescentes, le BCR n'est pas en monomère mais en oligomère auto-inhibé qui pourrait produire un signal tonique (Yang and Reth, 2010).

C) Signalisation du BCR dans les lymphomes non hodgkiniens

1. Le pré-BCR dans les LNH

Une étude a démontré que le pré-BCR pouvait être activé chez la cellule B immature. L'interaction avec des résidus chargés et glycosylés est capable d'entraîner une agrégation des pré-BCR ligand-indépendante (Ohnishi and Melchers, 2003). Cette agrégation va activer les kinases du BCR et permettre le recrutement des tyrosines kinases SYK et ZAP70 (ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa). Or l'altération de la signalisation du pré-BCR par SYK-BLNK contribue à la transformation des cellules B pouvant entraîner des leucémies (Wossning et al., 2006).

Par ailleurs, la perte de BLNK est fréquemment observée dans les pré-B-ALL. L'activation poussée du pré-BCR est alors nécessaire dans cette pathologie pour maintenir la survie. Différentes études ont mis en exergue la production d'IL-7, l'activation de la voie JAK/STAT et l'inhibition du facteur de transcription FOXO1 (Rickert, 2013). Par ailleurs BTK possède une fonction suppresseur de tumeur indépendante de sa fonction de kinase. Cette fonction est BLNK dépendante. Ainsi en l'absence de BLNK dans les pré-B-ALL, cette fonction de BTK est inhibée (Kersseboom et al., 2003).

Enfin, au sein des B-ALL, la majorité des patients présentent des mutations ou des translocations génétiques qui altèrent l'expression des facteurs de transcription PAX5, EBF1, RUNX1 et E2A. Or ces facteurs régulent des gènes cruciaux pour la structure et la signalisation du pré-BCR (Iacobucci et al., 2012).

Malignancy	Frequency*	Clinical features	Presumed cell of origin	Pre-dominant IgH isotype	SHM	Putative BCR signalling	Putative antigens	Evidence supporting BCR activity
Activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma (ABC DLBCL)	15%	Median age 66; nodal and extranodal; survival ~40% at 5 years	Post-germinal centre; plasmablast	IgM	Yes	Chronic active [†]	Auto-antigens	CD79B and CD79A ITAM mutations; RNAi: CD79A, IgM, IgL, SYK, BTK and CARD11; BCR clusters; ibrutinib response
Germinal centre B cell-like diffuse large B cell lymphoma (GCB DLBCL)	17%	Median age 61; nodal and extranodal; survival ~60% at 5 years	Germinal centre B cell	IgG	Yes	None or tonic	None	-
Burkitt's lymphoma	<1%	Median age 11 (children), 24 (adult); extranodal and nodal; survival >80% at 5 years	Germinal centre B cell	IgM	Yes	Tonic [†]	None	RNAi: CD79A and SYK
Follicular lymphoma	25%	Median age 57; nodal and bone marrow; survival 73% at 10 years	Germinal centre B cell	IgM	Yes	Chronic active	IgH-mannose-lectin interactions [‡]	Nonrandom IgH V region mutation; phospho-flow analysis
Chronic lymphocytic leukaemia (CLL)	8%	Median age 65; blood, bone marrow, spleen and nodal; survival 50% at 7 years	Pre-germinal centre mature B cell or memory B cell	IgM	M-CLL: yes; U-CLL: no	Chronic active	Auto-antigens and IgH V region framework 2	IgH V segment usage and stereotyped receptors; ibrutinib response
Mantle cell lymphoma (MCL)	7%	Median age 55; nodal, intestinal, blood and bone marrow; survival 50% at 3–5 years	Pre-germinal centre mature B cell	IgM	No	Chronic active	Unknown	IgH V segment usage and stereotyped receptors; ibrutinib response
Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma/marginal zone lymphoma (MALT/MZL)	9%	Median age 60; extranodal and bone marrow; survival >80% at 5 years	Marginal zone B cell	IgM	Yes	Chronic active	Bacterial and viral infection	IgH V segment usage and stereotyped receptors
Primary mediastinal B cell lymphoma (PMBL)	6%	Median age 33; mediastinal thoracic; survival >60% at 5 years	Thymic B cell	IgG [¶]	Yes	None	None	-
Hodgkin's lymphoma	11%	Bimodal median age: 25 and 60 years; mediastinal and nodal; survival 85% at 15 years	Thymic B cell	IgG [¶]	Yes	None	None	-

Tableau 3 : Indices attestant l'importance de la signalisation du BCR dans les lymphomes. BCR : B cell receptor ; BTK : Bruton tyrosine kinase ; CARD11 : caspase recruitment domain-containing protein 11 ; IgH : immunoglobulin heavy chain ; ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; M-CLL : CLL mutée ; RNAi : ARN interference ; SHM : hypermutation somatique ; U-CLL : CLL non mutée ; V : variable. *Pourcentage approximatif de sous-type de lymphome particulier parmi tous les patients avec un lymphome B. †Indique un mécanisme connu. ‡N'est pas un antigène, mais peu causer l'agrégation du BCR. ¶Ces pathologies expriment peu ou pas de BCR à la surface de leurs cellules (Tirée de Young and Staudt, 2013).

2. Le BCR dans les LNH

La plupart des lymphomes B maintiennent l'expression d'un BCR à la surface de leurs cellules, suggérant un important rôle de ce dernier dans les processus oncogénique. Ils utilisent essentiellement des IgM comme région constante de leur BCR alors que les cellules B normales sortant des centres germinatifs ont switché leur IgM pour une IgG qui favorise la différenciation cellulaire (Young and Staudt, 2013). L'importance du BCR est notamment démontrée à travers le cas des DLBCL issues de cellules B activées. En effet, cette pathologie nécessite une activation constante de la voie NF- κ B pour la survie de ces cellules, dont se charge la cellule à travers l'activation du BCR et la signalisation de la PI3K (Kraus et al., 2004). 20% des DLBCL issues de cellules B activées présentent également des mutations des motifs ITAMs qui rendent le BCR constitutivement actif en diminuant l'endocytose de celui-ci et en diminuant l'affinité pour LYN qui est capable d'opérer un feedback négatif sur CD79B (Davis et al., 2010). Ce LNH nécessite de fait une signalisation chronique du BCR pour son développement.

Une forme inhabituelle du BCR a également été observée dans les lymphomes folliculaires. Ce BCR est en effet capable de reconnaître les mannoses associés aux lectines présentes sur la surface des cellules stromales du microenvironnement. Cette reconnaissance du mannose comme antigène est capable d'induire l'agrégation du BCR et sa signalisation (Coelho et al., 2010).

Le lymphome de Burkitt pour sa survie a besoin de l'activation d'AKT et de la p70 S6 kinase par la PI3K. C'est la signalisation tonique du BCR qui apparaît comme capable d'activer la PI3K dans ses lymphomes. Plus particulièrement, 70% des lymphomes de Burkitt présentent des mutations du facteur de transcription E2A qui ont pour effet d'augmenter la quantité de BCR à la membrane (Schmitz et al., 2012).

L'ensemble des études réalisées ces dernières années sur le BCR, ont mis en avant son rôle majeur dans le développement des LNH. En effet, la stimulation du BCR entraîne l'activation de nombreuses voies de survie et permet la prolifération cellulaire dans nombre de LNH. Le rôle du BCR est notamment particulièrement déterminant dans la pathologie de la leucémie lymphoïde chronique. Ainsi, nombre de nouvelles thérapies se basent sur l'inhibition des voies de signalisation du BCR (Rickert, 2013; Young and Staudt, 2013).

I.E. Traitement des lymphomes non hodgkiniens

Jusqu'à assez récemment, la radiothérapie et la chimiothérapie étaient les méthodes de thérapies communément utilisées, parfois en combinaison, pour traiter les LNH. Les agents chimiothérapeutiques utilisés varient selon le sous-type de LNH et le stade de la pathologie. En effet, bien que proches et ayant des origines communes, les LNH se différencient par des caractéristiques cliniques ou des mutations propres à chacun des sous-types (Pour exemple, voir Tableau 3).

Le traitement le plus usité dans les divers LNH est le traitement CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine hydrochloride, vincristine sulfate et prednisone) (Tableau 4). Ce traitement est efficace contre la majorité des LNH mais, du fait de leur variété, il ne présente pas les mêmes niveaux de succès.

Drug	Mechanism of cell death	Reference
Cyclophosphamide	A prodrug that upon enzymatic and chemical activation forms phosphoramidate mustard, which creates intrastrand and interstrand DNA crosslinks inhibiting DNA replication	[8]
Doxorubicin	Interferes with DNA strand separation and strand relegation. Other mechanisms may also exist	[7,124]
Vincristine sulfate	Binds to tubulin and microtubules leading to mitotic arrest	[9]
Prednisone	Binds to the glucocorticoid receptor initiating the apoptosis process, which is finally completed by activation of caspases leading to mitochondrial dysfunction and cell death. The complete process is still poorly understood	[125,126]

Tableau 4 : Mécanisme des agents chimiothérapeutiques du traitement CHOP. (Tirée de Knapp and Whitehead, 2014).

Une avancée significative dans le traitement des LNH est apparue en 1997 avec l'arrivée de la première thérapie utilisant un anticorps monoclonal, le rituximab. Le rituximab est un anticorps monoclonal humanisé de souris capable de lier CD20, un antigène présent à la surface des cellules B. Le rituximab entraîne ainsi la lyse de la cellule B liée. Son utilisation en combinaison avec le traitement CHOP (R-CHOP) augmente drastiquement l'effet du traitement sans entraîner d'effets secondaires supplémentaires (Micallef et al., 2011). Le traitement R-CHOP est actuellement le traitement de référence pour les LNH, mais des variations ou d'autres agents sont également utilisés dans certains sous-types de LNH. Des thérapies sont toujours en développement. En effet, l'espérance de vie, tous LNH confondus, pour le traitement R-CHOP est de 71% sur 5 ans (Knapp and Whitehead, 2014).

Ainsi, d'autres agents chimiothérapeutiques ont été approuvés dans le traitement de certaines LNH. On retrouve l'anticorps radiothérapeutique ¹³¹I-tositumomab utilisé dans les lymphomes folliculaires (Morschhauser et al., 2008). Une combinaison d'anticorps monoclonal et d'agent chimiothérapeutique, le brentuximab vedotin, est utilisée dans les lymphomes hodgkiniens mais également dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (Moskowitz, 2014). Un inhibiteur du protéasome, un agent immunomodulateur, le lenalidomide, et une petite molécule inhibitrice, l'ibrutinib qui cible la signalisation du BCR, ont été approuvés pour utilisation dans les lymphomes du manteau (Dawar and Hernandez-Ilizaliturri, 2012; Kane et al., 2007; Wang et al., 2013).

A l'heure actuelle de nombreux inhibiteurs et agents chimiothérapeutiques sont en essai clinique pour validation, en particulier des inhibiteurs de la signalisation du BCR et de SYK (voir Tableau 5 et 6).

Study	Phase	N	Histology	ORR	Study
PI3Ki combinations					
GS1101 + ofatumumab	1	21	CLL	82%	Furman et al ⁵¹
GS1101 + rituximab	1/2	30	Indolent NHL	77%	Fowler et al ⁴⁴
GS1101 + rituximab	3	390	CLL	Ongoing	NCT01539512*
GS1101 + bendamustine ± rituximab	1/2	46	Indolent NHL	77%-85%	Fowler et al ⁴⁴
GS1101 + GS9973 (SYKi)	1	TBD	NHL	Ongoing	NCT01796470*
BTKi combinations					
Ibrutinib + R-CHOP	1b	33	Aggressive NHL	100%	Younes et al ⁵²
Ibrutinib + bendamustine + rituximab (BR)	1	11	NHL	38%	Blum et al ⁵⁰
Ibrutinib + bendamustine + rituximab	1/2	30	CLL	90%	O'Brien et al ⁴⁹
BR ± ibrutinib	3	580	CLL	Ongoing	NCT01611090*
Ibrutinib + ofatumumab	1/2	27	CLL	100%	Jaglowski et al ⁵³
CC292 + rituximab	1	TBD	CLL	Ongoing	NCT01744626*
CC292 + lenalidomide	1	TBD	CLL	Ongoing	NCT01766583*

TBD indicates to be determined; CLL, chronic lymphocytic leukemia; and NHL, non-Hodgkin lymphoma.

*NCT codes indicate ongoing studies with data available at www.clinicaltrials.gov.

Tableau 5 : Sélection de traitement en combinaison avec des inhibiteurs du BCR. (Tirée de Fowler and Davis, 2013).

Target	Inhibitor	Manufacturers	Clinical trials
Chronic active BCR signalling			
BTK	Ibrutinib (PCI-32765)	Pharmacyclics/Janssen Research & Development	Phase III
	Dasatinib	Bristol-Myers Squibb	Approved
	AVL-292	Celgene	Phase I
PKCβ	Sotrastaurin (AEB071)	Novartis	Phase I
PI3Kδ	GS-1101 (CAL-101)	Calistoga Pharmaceuticals/Gilead Sciences	Phase II
Chronic active and tonic BCR signalling			
SYK	Fostamatinib (R788)	Rigel Pharmaceuticals/AstraZeneca	Phase II
	PRT062607	Portola Pharmaceuticals/Biogen Idec	Phase I
Pan-PI3K	BKM120	Novartis	Phase I*
	GDC-0941	Genentech	Phase Ib*
	XL147	Exelixis	Phase I*
	ZSTK474	Zenyaku Kogyo Co.	Phase I*
SRC family	Saracatinib	AstraZeneca	Phase II
	KX01	Kinex Pharmaceuticals	Phase II
	Dasatinib	Bristol-Myers Squibb	Approved
TORC1	Rapamycin (sirolimus)	Wyeth/Pfizer	Approved
	Everolimus	Novartis	Phase III
	Temsirolimus	Wyeth/Pfizer	Approved

Tableau 6 : Inhibiteurs du BCR en essai clinique. BCR : récepteur des cellules B ; BTK : Burton tyrosine kinase ; PI3K : phosphoinositide-3-kinase ; PKCβ : protein kinase Cβ ; TORC1 : target of rapamycin complex 1. * Essais cliniques pratiqués dans des tumeurs solides uniquement (Tirée de Young and Staudt, 2013).

II. La leucémie lymphoïde chronique

II.A. Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) fait partie des lymphomes non hodgkiniens. C'est une hémopathie lymphoïde chronique caractérisée par l'accumulation d'une population monoclonale de lymphocytes B CD5+ et CD23+ dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes secondaires.

L'expression des antigènes CD5 et CD23 est quasi-constante dans la LLC et ils sont habituellement considérés comme des marqueurs d'activation de la cellule B car ils apparaissent après stimulation de lymphocytes B normaux (Caligaris-Cappio and Hamblin, 1999). Les cellules de LLC présentent également une faible densité des immunoglobulines de membrane (environ 10% de la densité d'une cellule B normale). Ces immunoglobulines de surface sont habituellement des IgM voire des IgD, rarement des IgG ou des IgA (Hashimoto et al., 1995).

Les cellules de LLC sont bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, et d'aspect morphologique mûr dans le sang où elles restent dormantes (Chiorazzi and Ferrarini, 2011). Elles se retrouvent en agrégats de différentes tailles dispersés dans les tissus lymphoïdes qui sont probablement des foyers de proliférations des cellules cancéreuses (Ponzoni et al., 2011; Schmid and Isaacson, 1994; Soma et al., 2006). De plus les cellules de LLC ont pour caractéristiques d'échapper aux mécanismes de mort par apoptose, contribuant ainsi à leur accumulation. Cette résistance à l'élimination par apoptose est notamment due à un haut niveau d'expression de protéines de la famille BCL-2 dans ces cellules (Kitada et al., 1998; Packham and Stevenson, 2005).

II.B. Epidémiologie

La leucémie lymphoïde chronique est la plus fréquente des leucémies de l'adulte dans les pays industrialisés, représentant environ 40% des leucémies chez les individus de plus de 65 ans. L'âge moyen du diagnostic est de 72 ans (Gribben, 2010). Il est très rare de diagnostiquer cette pathologie avant 40 ans, mais environ 30% des patients ont un âge inférieur à 65 ans. L'incidence de la maladie est en constante augmentation et atteint aujourd'hui un score d'environ 41 personnes par million d'habitants par an en occident. En France, elle représente 4 464 nouveaux cas par an, avec une incidence annuelle estimée à 4,4/100 000 habitants chez l'homme et 2,2/100 000 chez la femme (Institut de veille sanitaire, 2013). L'augmentation de cette incidence est essentiellement due d'une part au vieillissement général de la population et d'autre part, au dépistage plus précoce et précis de la pathologie.

60% des patients atteints de LLC sont des hommes. La LLC montre ainsi une incidence deux fois plus importante pour les hommes que pour les femmes. Elle montre également des variations ethniques avec une incidence plus faible chez les Asiatiques et les Afro-Américains comparée à celle des Caucasiens. Elle reste rare au Japon et en Asie en général, et si l'incidence augmente chez les japonais émigrés aux Etats-Unis, elle reste inférieure à celle des populations occidentales (Clarke et al., 2011; Rozman and Montserrat, 1995).

A ce jour les causes de l'apparition de la LLC sont encore inconnues. La présence de formes familiales (risque relatif 8,5 fois plus élevé chez les descendants de patients porteurs de cette pathologie) suggère l'existence de facteurs génétiques. Parmi ces facteurs, 20 polymorphismes génétiques ont été identifiés et pourraient expliquer une part du risque familial de transmission de cette pathologie (Berndt et al., 2013; Rebora et al., 2012). Malgré plusieurs études, aucun lien n'a pu être établi sur l'apparition de la maladie avec des causes environnementales, même si un impact environnemental est fortement suspecté au vu de la répartition mondiale de la LLC, touchant essentiellement les pays industrialisés.

II.C. Critères de diagnostic

La LLC se caractérise par une lymphocytose sanguine persistante depuis plus de trois mois avec au moins 5×10^9 lymphocytes par litre de sang, associée à des critères morphologiques et immunophénotypiques lymphocytaires caractéristiques de la maladie (Hallek et al., 2008).

La LLC se caractérise également par une morphologie atypique. Les lymphocytes sont petits avec peu de cytoplasme et noyau rond présentant une chromatine compacte, sans nucléole. L'examen du frottis sanguin montre de nombreuses cellules écrasées (ombres de Gumprecht), traduisant la fragilité des petits lymphocytes quantités de cytoplasme. La présence de prolymphocytes, cellules de grandes tailles atypiques à noyau nucléolé, est toujours observée, mais leur quantité peut varier de moins de 1% jusqu'à 55% de la population lymphocytaires (Hsi, 2012).

Lorsqu'un patient présente une lymphocytose inférieure à $5 \times 10^9/L$ de sang, dont plus de 50% des lymphocytes présentent les caractéristiques immunophénotypiques de la LLC, en absence d'organomégalie, de cytopénie ou de maladies auto-immunes, le diagnostic retenu est celui de la lymphocytose B monoclonale (D'Arena and Musto, 2014).

Lorsque les cellules de LLC infiltrant les organes lymphatiques (ganglions lymphatiques, rate et thymus) mais que le nombre de lymphocytes B dans le sang périphérique n'excède pas $5 \times 10^9/L$, il s'agit d'un lymphome lymphocytaire à petites cellules (SLL : small lymphocytic lymphoma). D'après l'organisation mondiale de la santé, la LLC et la SLL sont les mêmes maladies avec des formes cliniques différentes (Gribben, 2010).

Le diagnostic est également basé sur le profil immunophénotypique des cellules leucémiques. Celles-ci vont être caractérisées par l'expression des marqueurs CD5, CD19 et CD23 ; de faibles densités d'immunoglobuline de surface (IgM ou IgD) avec des chaînes légères monotypiques (κ ou λ) ; l'absence du marqueur FMC7 (épitope CD20) et la détection de CD38 et ZAP-70 dont l'expression va être lié à un mauvais pronostic (Hsi, 2012).

A partir de ces critères, le pathologiste va pouvoir ainsi déterminer s'il s'agit d'une LLC ou l'exclure via un système de « score » : le Système de score du Royal Marsden Hospital (score de Matutes) (Tableau 5) (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997). Il attribue un « score » à chacun des 5 marqueurs suivants :

Antigène	Attribuer 1 point si	0 point si
Ig membranaire	Faiblement exprimée	Forte expression
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 ou CD79b	Faiblement exprimé	Forte expression

Tableau 5 : Système de score du Royal Marsden Hospital (score de Matutes). Adaptée de (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997).

Si le score est supérieur à 4, le diagnostic de LLC est retenu. Si le score est inférieur à 3, le diagnostic de LLC est écarté. Dans le cas d'un score égal à trois, le diagnostic de LLC peut être retenu si les cellules lymphoïdes expriment les molécules CD5, CD23 et CD43, si l'expression du CD20 est faible et si la recherche de cycline D1 est négative. Ainsi 92% des LLC ont un score total de 5 ou 4.

La LLC est une maladie considérée comme indolente. En effet, sa survenue chez des patients âgés, l'abstention thérapeutique consensuelle au stade précoce de la maladie et de l'existence de causes de décès non liées à la maladie chez les sujet âgés ont contribué à l'idée d'une pathologie dormante ou très lente dans son évolution. En réalité, cette évolution est extrêmement variable d'un patient à l'autre. Ainsi, un tiers des patients ne nécessitera jamais de traitement, un tiers présentera une phase indolente suivie d'une phase de progression de la maladie, et un dernier tiers présentera une forme d'emblée agressive nécessitant une thérapeutique immédiate. Face à cette hétérogénéité de forme agressive ou non de la LLC, il devient nécessaire de disposer de critères pronostiques permettant de définir les profils à risque de développer une forme aiguë de la maladie et de proposer à ces patients des stratégies thérapeutiques adaptées.

Les critères de pronostiques de la virulence de la maladie se basent sur des classifications cliniques. Ces dernières années, l'apport des données issues des études immunologiques, chromosomiques et moléculaires permettent de confirmer ces pronostics et d'établir des stratégies thérapeutiques les plus adaptées.

II.C.1 Les classifications de Rai et Binet

Le développement de deux classifications cliniques différentes en 1975 par Rai (Rai et al., 1975) et en 1981 par Binet (Binet et al., 1981) a permis de diviser les patients atteints de LLC en trois grands groupes pronostiques : un groupe de bon pronostic, un de pronostic intermédiaire et enfin un groupe de mauvais pronostic.

a) La classification de Rai

Dans son étude initiale de 1975, menée sur 125 cas, Rai intègre pour la première fois dans une classification plusieurs facteurs cliniques aboutissant à définir 5 stades de la maladie (Rai et al., 1975) :

- Le stade 0 caractérisé par une lymphocytose isolée
- Le stade I défini par une lymphocytose sanguine associée à des adénopathies
- Le stade II défini par une lymphocytose sanguine associée à une splénomégalie et/ou hépatomégalie avec ou sans adénopathie
- Le stade III est caractérisé par une lymphocytose sanguine associée à une anémie
- Le stade IV caractérisé par une lymphocytose sanguine associée à une thrombopénie

Rapidement, ces 5 classes vont être regroupées en trois stades de gravité croissante : faible (stade 0), intermédiaire (stade I et II) et forte (stade III et IV).

b) La classification de Binet

La classification de Binet, datant de 1981, permet la classification de la maladie en trois stades selon le degré de développement tumoral et l'association d'une cytopénie sanguine (Binet et al., 1981) :

- Le stade A : lymphocytose sanguine avec moins de trois aires ganglionnaires
- Le stade B : lymphocytose sanguine avec au moins trois aires ganglionnaires atteintes
- Le stade C : lymphocytose sanguine associée à une anémie et une thrombopénie, quelque soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes.

Cette classification est rapidement devenue la classification de référence car une étude comparative de ces deux classifications, dans une série prospective portant sur 935 patients, a montré que le groupe à faible risque de Binet inclut le double de malades par rapport au groupe de bon pronostic de Rai et que l'abstention thérapeutique est la règle pour ces malades.

Les différences entre ces deux classifications sont mineures. Elles portent sur le seuil de taux d'hémoglobine définissant les formes de mauvais pronostic (stade C de Binet équivaut aux stades III-IV de Rai) et sur l'existence d'un stade 0 dans la classification de Rai (Dighiero et al., 1991).

II.C.2. Critères biologiques

a) Temps de doublement des lymphocytes (TDL)

Le TDL correspond au temps nécessaire pour obtenir un doublement du taux absolu de lymphocytes dans le sang. Il reflète l'activité de la maladie. Un TDL supérieur à 12 mois est un indicatif de bon pronostic caractérisé par une longue période d'abstention thérapeutique et une augmentation de la survie. A l'inverse, une augmentation de 50% du nombre de lymphocyte en moins de deux mois ou un TDL de moins de 6 mois correspond à des formes agressives et va nécessiter un traitement immédiat du patient (Hallek et al., 2008).

b) Les marqueurs sériques classiques

Les trois marqueurs sériques les plus importantes chez les patients atteints de LLC sont les taux sériques de β 2-Microglobuline ($s\beta$ 2m), de thymidine kinase (TK), et de CD23 soluble (s CD23). Contrairement à d'autres néoplasies lymphoïdes, le taux sérique de lactate déshydrogénase (LDH) s'est avéré moins pertinent chez les patients atteints de LLC (Cramer and Hallek, 2011).

- **β 2-Microglobuline** : Protéine extracellulaire liée de manière non covalente aux chaînes α des CMH de classe I. Des niveaux élevés de cette protéine sont marqueurs de mauvais pronostic. Un fort taux de $s\beta$ 2m est de plus corrélé avec des niveaux élevés de CD38 et de ZAP70 ainsi qu'une infiltration médullaire des cellules de LLC (Gentile et al., 2009).
- **Thymidine kinase** : La thymidine kinase (TK) est une enzyme cellulaire impliquée dans les voies de synthèse de L'ADN. Elle est présente dans les cellules en phase de division cellulaire et absente des cellules ne se divisant pas. De ce fait, elle a été proposée comme marqueur de prolifération cellulaire. L'augmentation de son taux sérique chez des patients atteints de LLC est corrélée avec le stade et la progression de la maladie (Hallek et al., 1999).
- **CD23 soluble** : Récepteur de faible affinité aux IgE qui est physiologiquement exprimé chez les cellules B matures, les cellules présentatrices d'antigènes et les plaquettes. Son taux de doublement dans le sérum est un marqueur de mauvais pronostic s'il est inférieur à 1 an (Meuleman et al., 2008).

c) Infiltration médullaire et aspects morphologiques

Dans une étude portant sur 329 patients, il a été démontré que la topographie de l'infiltration médullaire par les lymphocytes pathologiques était corrélée au pronostic. Ainsi, une infiltration diffuse plutôt que nodulaire est associée à un mauvais pronostic (Hallek et al., 2008). Toutefois, ces données sont surtout applicables aux stades avancés de la maladie car rarement retrouvées dans les stades A. A l'inverse, les atypies morphologiques des lymphocytes constituent un facteur pronostic important dans les stades A : la présence de plus de 10% de prolymphocytes ou de 15% de cellules lymphoplasmocytaires s'accompagne le plus souvent d'un doublement rapide des lymphocytes sanguins et d'une augmentation du volume tumoral (Oscier et al., 1997).

II.C.3. Nouveaux facteurs de pronostic

a) Altérations génétiques

Parmi les patients atteints de LLC, il est possible de retrouver chez 80% d'entre eux, à l'aide d'une simple détection par FISH (Fluorescent In-Situ Hybridation : hybridation in-situ par des sondes fluorescentes), au moins une anomalie cytogénétique (Dewald et al., 2003). Dans certains cas, plusieurs de ces anomalies cytogénétiques peuvent être retrouvées.

- **Délétion 13q14** : Il s'agit de l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les cellules de LLC. Elle est retrouvée chez 55% des malades. Cette délétion est le plus souvent monoallélique (76%)

mais peut être aussi biallélique (24%) (Dohner et al., 2000). Isolée, elle est corrélée à une meilleure survie globale : 133 mois versus 111 mois chez les patients présentant un caryotype normal. Cette région contient une région minimale de délétion (MDR) contenant le gène d'un ARN non codant DLEU2 et le premier exon du gène DLEU1 (Calin et al., 2008; Klein et al., 2010). Les micro-ARN, miR-15a et miR-16-1, ont également été identifiés dans cette MDR. Une étude a caractérisé le rôle physiopathologique de ces miARN en étudiant le phénotype de souris génétiquement modifiées portant une délétion ciblée du locus des miR-15a et 16-1 en combinaison avec une délétion de l'ARN non codant DLEU2. Ces animaux développaient alors des troubles semblables à des leucémies monoclonales, des LLC et des lymphomes ; suggérant que les micro-ARN miR-15a et miR-16-1 jouent un rôle dans les mécanismes de la leucémogénèse de la LLC (Klein et al., 2010).

- **Délétion 11q22-q23** : Cette délétion est rare dans les stades précoces de la maladie, mais présente chez 18% des patients à un stade avancé. Sur le plan clinique, les LLC présentant ce type de délétion ont une évolution plus rapide avec un syndrome tumoral important, un intervalle de temps avant traitement plus court, présentent une résistance aux chimiothérapies et une survie globale plus courte du patient avec une moyenne de 79 mois (Dohner et al., 2000). Sur un plan moléculaire, toutes les délétions affectent une région consensus minimale sur la région 11q22-q23.1 contenant le gène qui code pour la protéine kinase ATM (ataxia-telangiectasia-mutated) qui joue un rôle essentiel dans les voies de dommage à l'ADN. On retrouve des mutations d'ATM dans 9% des cas de LLC, et approximativement un tiers de ces d'entre eux présente une délétion 13q14 (Wang et al., 2011b).
- **Trisomie 12** : Première anomalie récurrente décrite dans la LLC, elle est retrouvée dans environ 16% des cas. Elle résulte le plus souvent de la duplication totale d'un des deux chromosomes 12. L'impact pronostique de cette altération est nul en termes de survie. De plus, l'incidence de la trisomie 12 n'augmente pas avec le stade de progression de la maladie ou la résistance aux traitements (Dohner et al., 2000). De façon intéressante, un des gènes situé sur le chromosome 12 code pour l'ubiquitine ligase MDM2 (murine double minute 2), qui est capable de se lier à la protéine p53 et d'induire sa dégradation via un mécanisme dépendant du protéasome.
- **Délétions 17p13 ou mutation de TP53** : Cette délétion est retrouvée dans 7% des cas de LLC (Dohner et al., 1995; Dohner et al., 2000). Environ 80% des patients avec une délétion monoallélique 17p13 présentent une mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53* sur l'autre allèle. Bien que ces délétions peuvent être de différentes tailles, elles incluent toujours la délétion de la bande 17p13 contenant le gène *TP53* codant pour la protéine p53 (Fabris et al., 2008). Les patients présentant une mutation de *TP53* sans délétion 17p représentent 4,5% (Zenz et al., 2008). La délétion 17p ou les mutations de *TP53* présentent la plus faible survie globale chez les patients (32 mois en moyenne) et une mauvaise réponse thérapeutique, notamment aux agents alkylants ou à la fludarabine (Figure7). Ces mutations se retrouvent d'ailleurs chez 45% des patients réfractaires ou rechutant après traitement (Stilgenbauer et al., 2009; Zenz et al., 2008). D'autres mécanismes que la délétion 17p altèrent la voie p53 et sont associés à la

pathologie de la LLC. Ces mécanismes impliquent les protéines ATM qui régulent p53 à un niveau protéique (Kojima et al., 2006) ou encore miR-34 une cible de p53 (Zenz et al., 2009).

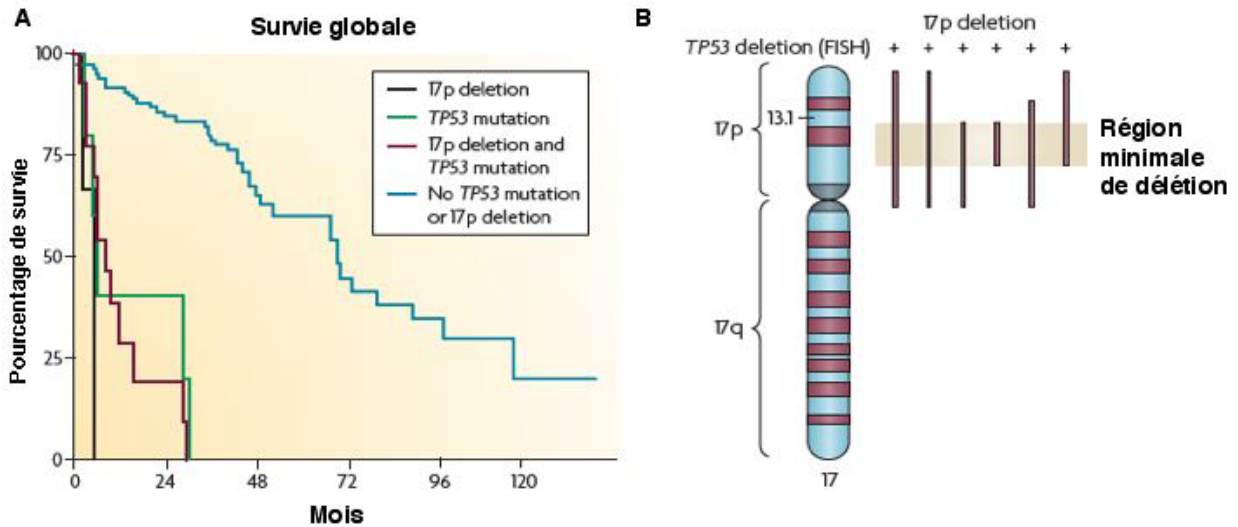


Figure 7 : Mutations/Délétions de TP53 dans les LLC. A. Comparaison des courbes de survie globale des patients présentant ou pas une délétion ou une mutation de TP53. **B.** Représentation schématique des différentes régions délétées de la bande 17p (bandes rouges). La région minimale de délétion est représentée en marron. (Tirée de Zenz et al., 2010)

- **Autres anomalies :** D'autres anomalies cytogénétiques peuvent être retrouvées dans la LLC, mais celles-ci sont d'une fréquence plus rare et ne sont donc que rarement prises en compte à l'établissement d'un facteur de pronostic. Il est ainsi possible d'observer une délétion sur le bras long du chromosome 6 (del6q), une translocation 14q32, des trisomies du bras long du chromosome 3 et des trisomies du chromosome 8 (Dewald et al., 2003; Shanafelt et al., 2006; Stilgenbauer et al., 1999).

b) Nouvelles altérations génétiques

Les techniques modernes de séquençage et d'analyse du génome ont permis de mettre en évidence ces dernières années de nouvelles mutations retrouvées plus ou moins fréquemment dans la LLC. Ces gènes peuvent altérer des voies de signalisation d'une importance capitale au sein de la cellule leucémique et tendent petit à petit à devenir des facteurs de mauvais pronostic dans l'évolution de la pathologie et la résistance aux traitements.

- **NOTCH1 :** Cette mutation, retrouvée chez près de 12% des patients atteints de LLC, est plus fréquente chez les patients présentant un statut des chaînes lourdes des immunoglobulines non-mutées ou dans des cas de trisomie 12. Il s'agit en général d'une mutation activatrice de la voie NOTCH1 ; en effet, elle va inhiber la dégradation de la protéine NOTCH1 en altérant son domaine C-terminal PEST (proline (P), glutamate (E), sérine (S), et thréonine (T)) et favoriser

l'accumulation de sa forme active. Cette mutation est synonyme de mauvais pronostic avec un impact comparable à des patients présentant une mutation de *TP53* (Rossi et al., 2012b).

- **SF3B1** : Retrouvé chez près de 10% des cas, cette mutation altère le complexe d'épissage alternatif de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Par-là, elle contribue à augmenter la survie et la prolifération des cellules cancéreuses et constitue un marqueur de mauvais pronostic (Wang et al., 2011b).
- **BIRC3** : Baculoviral IAP repeat-containing protein 3 (BIRC3) est un membre de la famille IAP (inhibiteur de l'apoptose). BIRC3 peut également agir comme une E3-ubiquitine ligase capable de réguler le facteur nucléaire κ B. Dans les LLC, sa mutation dans le domaine RING C-terminal prévient la dégradation par le protéasome de MAP3K14 et ainsi activer de la voie NF- κ B. Cette mutation n'est retrouvée que dans 4% des LLC, mais 24% des LLC réfractaires aux traitements. C'est un marqueur de mauvais pronostic complètement indépendante des autres facteurs de pronostic (Rossi et al., 2012a).
- **Autres mutations** : Les techniques de séquençage ont relevés d'autres mutations de faibles fréquences pour la LLC. On retrouve ainsi des mutations de *XPO1* (2,9%), *MYDD88* (2,4%), de *KLHL6* (1,8%) et des mutations touchant l'une ou l'autre des protéines de la voie *Wnt*. Toutes conduisent à l'activation des voies dans lesquelles, elles sont impliquées. XPO1 est fréquemment associé à un statut des chaînes lourdes des immunoglobulines non-mutées alors que MYDD88 et KLHL6 sont associés à un statut muté. De plus, contrairement à la plupart des autres mutations, lorsqu'elle est présente, la mutation MYDD88 se retrouve dans toutes les cellules leucémiques du patient laissant supposer qu'il s'agit d'une mutation initiatrice de la pathologie (Hsi, 2012; Zhang and Kipps, 2014).

c) Valeur pronostique du statut mutationnel des Immunoglobulines

L'étude des immunoglobulines (Ig) des cellules de LLC s'est révélée majeure sur le plan pronostic. En effet, deux clones de cellules B ont très peu de chances de présenter le même récepteur aux cellules B (BCR) (environ une probabilité de 10^{-12}). Or chez certains patients, il n'est pas rare de trouver des cellules présentant des caractéristiques stéréotypiques ou structurales similaires voire identiques de leur BCR. La LLC est ainsi divisée en deux groupes de fréquence équivalente, l'un présentant de nombreuses mutations somatiques des gènes codants pour les régions variables des chaînes lourdes des Ig (IgVH), l'autre non muté dans lequel ces séquences sont en configuration germinale (Hashimoto et al., 1995). La limite de 98% d'homologie de séquence avec les gènes en position germinale des IGvH est utilisée pour séparer les deux groupes. Ces paramètres se sont avérés être une valeur pronostique majeure (Figure 8).

En 1999, deux groupes indépendants (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999) montrent que les formes mutées de la maladie ont une évolution lente (survie médiane de 293 mois) et les formes non-mutées ont une évolution rapide et nécessite un traitement (survie médiane de 95 mois). Cependant,

cette discrimination pronostique entre les deux formes ne s'applique que chez les patients au stade A (Hamblin et al., 1999) ou en stade intermédiaire de Rai (Damle et al., 1999).

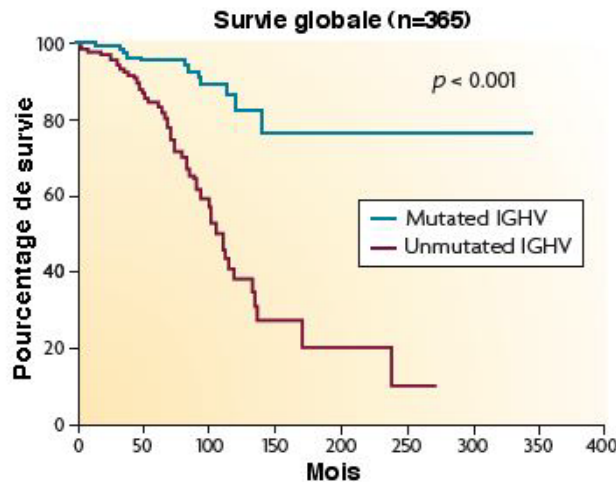


Figure 8 : Comparaison des courbes de survie globale des patients atteints de LLC présentant un statut muté des Ig (courbe bleue) et ceux présentant un statut non-muté (courbe rouge). Il s'agit d'une étude rétrospective sur une cohorte de 365 patients. La survie médiane pour les statuts non-mutés est de 111 mois alors qu'elle n'est pas atteinte pour les statuts mutés (Tirée de Zenz et al., 2010)

Le statut mutationnel des Ig est devenu « le gold standard » pour évaluer au diagnostic le pronostic des patients atteints de LLC. Cependant la technique d'évaluation du statut mutationnel des Ig est coûteuse et nécessite une expertise particulière. De nombreux efforts ont été faits pour identifier des marqueurs de substitution au statut mutationnel des Ig avec la même valeur pronostique. Parmi ces marqueurs, l'expression de CD38, ZAP-70, la LPL et ADAM29 ont été proposées.

d) CD38

L'expression de CD38 a été, par le passé, corrélée au statut mutationnel des gènes des IgVH (Damle et al., 1999). La positivité pour CD38 était associée à une survie globale plus courte des patients et à une nécessité de traitement plus importante. Par conséquent, les auteurs ont proposé l'expression de la molécule CD38 comme un possible facteur de substitution du statut mutationnel des IgVH. Cependant, des études ultérieures n'ont pas confirmé sa place en tant que marqueur pronostique de substitution face au statut mutationnel des IgVH, mais plutôt en tant que facteur pronostique indépendant (Del Poeta et al., 2001; Hamblin et al., 2002). En effet, CD38 ne prédit correctement le statut mutationnel que chez 70% des patients. De plus, l'expression de CD38 varie au cours de la maladie. Mais son expression reste un marqueur de mauvais pronostic efficace pour la LLC (Hayat et al., 2006).

e) ZAP-70

La protéine tyrosine kinase (PTK) ZAP-70 (zeta-chain-associated-protein 70) participe à la signalisation dans le complexe du récepteur aux cellules T (TCR). ZAP-70 se retrouve exprimée dans des cellules leucémiques alors qu'elle est absente des lymphocytes B (Chen et al., 2002). Sa présence semble permettre de prédire la survie sans traitement et la survie globale du patient. Si plus de 20% de cellules leucémiques d'un patient expriment ZAP-70, alors ce dernier est classé ZAP-70 positif. (Crespo et al., 2003; Rassenti et al., 2004; Schroers et al., 2005; Wiestner et al., 2003). En outre, l'expression de ZAP70 semble être un marqueur de prédiction du statut de mutation des IgVH supérieur à l'expression de CD38, et ceci, même chez les patients à un stade précoce asymptomatique de la pathologie (Rassenti et al., 2008). En effet, l'expression de ZAP-70 est associée aux formes IgVH non-mutées (Rosenwald et al., 2001) et les cellules de LLC IgVH non-mutées expriment 5,54 fois plus de ZAP-70 que les cellules de LLC IgVH mutées. 93% des patients pourraient être correctement classés selon leur statut mutationnel de leur IGHV. La concordance entre l'expression de ZAP70 et le statut mutationnel des IgVH varie de 77 à 95% (Crespo et al., 2003; Orchard et al., 2004; Rassenti et al., 2004; Wiestner et al., 2003).

Toutefois, certaines caractéristiques cytogénétiques comme del (11q), del (17p) et la mutation V3-21 des IgHV sont des marqueurs de très mauvais pronostic avec des survies globales de courte durée et sont associées à une absence de ZAP-70. De plus la discordance entre les niveaux d'expression de ZAP-70 et le statut mutationnel des IgVH reste assez fréquente (de 8 à 30%) (Crespo et al., 2003; Krober et al., 2006; Orchard et al., 2004; Rassenti et al., 2004). La stabilité de l'expression de ZAP-70 dans le temps par le clone leucémique est une condition importante pour une utilisation fiable de cette protéine comme marqueur pronostique. Or certaines études ont rapporté des variations d'expression de ZAP-70 au cours de l'évolution de la maladie (Del Principe et al., 2006; Rassenti et al., 2004; Schroers et al., 2005).

f) LPL/ADAM29

Les gènes codants pour la lipoprotéine lipase (LPL) et ADAM29 sont respectivement surexprimés dans les LLC-B non-mutées et mutées (Vasconcelos et al., 2005). Sur la base des différences de profil d'expression entre ces deux groupes, il fut proposé que ces gènes servent de facteurs pronostiques de substitution au statut mutationnel des Ig.

La LPL est une enzyme ayant un rôle central dans le métabolisme et le transport des lipides. Le gène ADAM29 (a disintegrin and metalloproteinase domain 29) code pour une protéine transmembranaire de la famille des désintégrines et métalloprotéases qui permettrait l'interaction cellule à cellule et/ou cellule à matrice. Une étude française (Opezzo et al., 2005), réalisée sur 127 patients, utilise le ratio d'expression des ARN messager de la LPL et ADAM29 pour distinguer deux sous groupes de patients de pronostics différents. Dans 90% des cas, le ratio LPL/ADAM29 prédit correctement le statut mutationnel des Ig. De plus, les patients avec un rapport LPL/ADAM29 supérieur à 1 ont une médiane de survie supérieure aux patients avec un rapport inférieur à 1. La valeur pronostique du rapport LPL/ADAM29 est comparable au ZAP-70 chez les patients de stade A de la classification de Binet. De plus, ce nouveau marqueur est un facteur pronostique indépendant chez les patients de stade B ou C contrairement à ZAP-70 (Maloum et al., 2009; Opezzo et al., 2005).

g) Autres facteurs pronostiques

De nombreux autres marqueurs ont récemment été identifiés comme facteurs pronostiques potentiels. C'est le cas de CLLU1 (CLL upregulated gene1) qui permet de distinguer une LLC des autres hémopathies malignes (Oppliger Leibundgut et al., 2012) et d'AID (Activation-induced cytidine deaminase), de la protéine TCL-1 (T cell leukemia 1) ou encore certains micro-ARN (Van Bockstaele et al., 2009).

La multiplicité des marqueurs pronostiques de la LLC permet une meilleure prise en charge thérapeutique de la maladie au niveau individuel. Leur valeur prédictive est essentielle, surtout pour les patients diagnostiqués à un stade précoce de la maladie, afin de définir les malades ayant un risque de développer des formes agressives. Même si aucun marqueur ne permet d'affirmer de manière tout-à-fait claire les risques qu'encourent un patient, les informations supplémentaires apportées par ces marqueurs vont permettre d'établir des traitements adéquats en fonction des différentes caractéristiques mutationnelles ou autres que peut présenter le malade.

II.D. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique

L'étiologie demeure globalement méconnue. Toutefois, depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont apporté un nouveau visage quant à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénie de cette maladie. La LLC représente le prototype de tumeur dans laquelle le phénomène d'apoptose s'avère défectueux concourant ainsi à la survie des cellules in vivo. Néanmoins, une composante proliférative, présente dans la moelle osseuse et les organes hématopoïétiques secondaires, s'avère nécessaire pour alimenter le pool circulant de lymphocytes (Zhang and Kipps, 2014). La majorité de ces cellules B leucémiques circulantes apparaissent bloquées en phase GO/G1 du cycle cellulaire suggérant que cet excès clonal de lymphocytes B résulterait plus d'un défaut d'apoptose que d'une augmentation de la prolifération cellulaire (Reed, 1998). Ce défaut d'apoptose n'a pas de mécanisme univoque et reste imparfaitement compris. Par ailleurs, le fait qu'il existe une évolution clonale traduisant une part proliférative, une sensibilité des cellules aux signaux délivrés par les types de microenvironnements et les multiples facettes évolutives de la maladie suggèrent l'intrication de mécanismes beaucoup plus complexes qu'il n'y paraît.

I.D.1. Signalisation issue du BCR dans la LLC

a) Signalisation du BCR dans la leucémie lymphoïde chronique

La structure du BCR diffère également selon les deux groupes, LLC IgVH non-mutée versus mutée. Une forte proportion des LLC IgVH non-mutée présente un réarrangement stéréotypé de leurs segments VDJ. En effet, de récentes études ont mis en évidence l'existence de sous-groupes parmi les patients atteints de LLC. Le plus important (30% des patients) présente des chaînes lourdes des Ig avec une séquence stéréotypique dans la région complémentaire déterminante 3 (VHCDR3) (Agathangelidis et al., 2012). D'autres sous groupes ont été identifiés, un pour la reconnaissance de l'antigène β -(1,6)-glucan, spécifique des champignons (Hoogeboom et al., 2013) et un autre pour MALT (Craig et al., 2010).

De plus, plus d'1% des patients pourraient exprimer des Igs identiques (Widhopf et al., 2004). Le degré remarquable de restriction structurelle du BCR dans la LLC suggère que le BCR soit hautement sélectionné, et qu'un antigène commun participe à la pathogénie de la LLC. En effet, toutes les familles de gènes codant pour les IgVH sont retrouvées dans la LLC, mais seul un certain nombre est exprimé par les cellules leucémiques. De plus, certains gènes sont retrouvés préférentiellement associés à une forme de LLC. Ainsi, le gène VH1-69 est associé le plus souvent aux formes non-mutées alors que d'autres gènes tels que VH4-34, VH1-07 et VH3-21 sont associés aux formes mutées de LLC. La nature de l'antigène impliqué reste encore inconnue, mais pour certaines formes de LLC, il semblerait qu'un auto-antigène soit impliqué puisque la moitié des cellules de LLC produit des anticorps autoréactifs (Zenz et al., 2010). Ces autoantigènes se retrouveraient en grande concentration dans les ganglions lymphatique, plutôt que dans la circulation sanguine participant au phénomène de niche de prolifération pour la LLC.

L'existence d'un signal tonique excessif au niveau du BCR des cellules leucémiques de LLC a été suggérée suite à une étude ayant montré une activité basale élevée de la molécule LYN (Contri et al., 2005). Cette dernière est connue pour être impliquée dans les régulations positives et négatives du BCR. À ce titre, son inhibition par des inhibiteurs des SRC kinases, tels que PP2 ou SU6656, induit l'apoptose des cellules leucémiques, indiquant que LYN participe à la transmission de signaux de survie cellulaire.

Le signal généré au niveau du BCR par un antigène est capable de réguler la prolifération, la survie et l'apoptose dans les cellules B en développement (Niiri and Clark, 2002). L'engagement du BCR par les Ig va recruter BLK, FYN ou LYN. LYN est activée soit par autophosphorylation, soit par transphosphorylation par SYK et va phosphoryler cette dernière. Des études génétiques et biochimiques ont montré que SYK était capable de s'activer par autophosphorylation en l'absence de LYN (Kurosaki et al., 1994; Takata et al., 1994). De plus, SYK est capable de phosphoryler les résidus tyrosines présents sur les régions ITAMs des Ig α et Ig β (Rolli et al., 2002). Grâce à sa capacité à phosphoryler les motifs ITAMs et son activité kinase plus importante, SYK semble moins dépendante des SRC kinases pour son activation que ZAP-70 (Latour et al., 1996).

b) Expression de SYK et ZAP-70 dans la leucémie lymphoïde chronique.

SYK et ZAP-70 sont les deux seuls membres de la famille des kinases SYK. SYK est fortement surexprimée dans la LLC comparé à des sujets sains. Cette surexpression, aussi bien de la protéine SYK totale que de sa forme phosphorylée est encore plus prononcée dans les LLC présentant des IgVH non mutées (Buchner et al., 2009). SYK ne présente aucune mutation dans les LLC. Cette surexpression serait donc probablement dû au variant d'un SNP dans l'élément régulateur 5' de l'ARN messager de SYK ou à une modification épigénétique qui augmenteraient l'acétylation des histones ou entraîneraient une perte de la méthylation de l'ADN (Philippen et al., 2010).

ZAP-70 est fortement exprimé dans les cellules T et est connu pour son rôle de la transduction du signal du TCR. Dans la LLC sa présence est marqueur de mauvais pronostic et fréquemment relié au statut CD38⁺ et IgVH non mutées (Rassenti et al., 2008; Rosenwald et al., 2001). La stimulation du BCR par un anticorps anti-IgM, induit la phosphorylation de ZAP-70 et de SYK. Cette phosphorylation intervient dans la transduction du signal du BCR et entraîne la phosphorylation et le recrutement de

protéines adaptatrices et des molécules de signalisation en aval. Des études de co-immunoprécipitation ont montré que ZAP-70, structurellement proche de SYK, peut s'associer avec le BCR dans les cellules leucémiques stimulées par l'antigène, indiquant une potentielle fonction modulatrice de la voie de signalisation du BCR. De plus, dans des lignées cellulaires de lymphome BJAB, la surexpression de ZAP-70 entraîne une diminution du taux d'internalisation des ligands liés au BCR. Egalement, l'expression ectopique de ZAP-70, dans des cellules de LLC et dans des lignées cellulaires de lymphomes, montre une activation de molécules des voies de signalisation comme SYK, BLNK et de la PLC γ accompagnée d'une augmentation de l'activité calcique intracellulaire et d'une activation de NF- κ B plus importantes après stimulation du BCR (Gobessi et al., 2007).

De manière surprenante, les tyrosines majeures nécessaires à l'activité kinase de ZAP-70, (Tyr319 et Tyr493) n'apparaissent pas phosphorylées après stimulation du BCR, suggérant ainsi que l'activation de ZAP-70 est négligeable ou absente dans les cellules leucémiques. L'activité kinase de ZAP-70 n'est probablement pas le facteur responsable de l'augmentation de la signalisation issue du BCR (Deglesne et al., 2006), par contre il pourrait s'agir de son rôle adaptateur. En effet, les fonctions adaptatrices de ZAP-70 apparaissent conservées comme en témoigne sa capacité à recruter des régulateurs importants de la voie de signalisation du BCR, telles que c-CBL, CBL-b, SHC et la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K.

Ainsi, par la liaison au BCR et à SYK, les cellules exprimant ZAP-70 sont plus compétentes que les cellules ZAP-70 négatives à recevoir des signaux de survie et de prolifération de manière chronique par un antigène de l'environnement ou un autoantigène.

II.D.2. Rôle du microenvironnement

Au sein de la moelle épinière et des organes lymphoïdes secondaires, la LLC est engagée dans des interactions moléculaires et cellulaires complexes et mal définies avec les cellules stromales, les cellules environnantes et la matrice que l'on nomme collectivement « microenvironnement » (Burger et al., 2009a). Ces interactions affectent la survie des cellules de LLC, leur prolifération et vont contribuer à la résistance aux traitements. En effet, les cellules de LLC cultivées *In vitro* vont connaître une rapide mort par apoptose, néanmoins, la présence de cellules stromales les protège de cette mort cellulaire spontanée (Lagneaux et al., 1998).

Le microenvironnement, par différentes populations cellulaires va permettre l'interaction avec les cellules malignes, par contact direct ou via l'intermédiaire de facteurs solubles, et promouvoir ainsi leur survie et leur prolifération. Ces processus impliquent la stimulation du BCR et des molécules de co-stimulation à la surface des cellules de lymphomes, mais également les récepteurs aux chimiokines (Burger, 2011). Parmi ces interactions, les facteurs extrinsèques occupent une place privilégiée dans la survie des cellules leucémiques. Celles-ci se font dans des compartiments particuliers (Messmer et al., 2005), les centres de prolifération pseudofolliculaires qui sont spécifiques de la LLC. Dans ces centres, les cellules de LLC vont s'entourer des cellules accessoires favorables à leur propre survie (Ghia et al., 2005b).

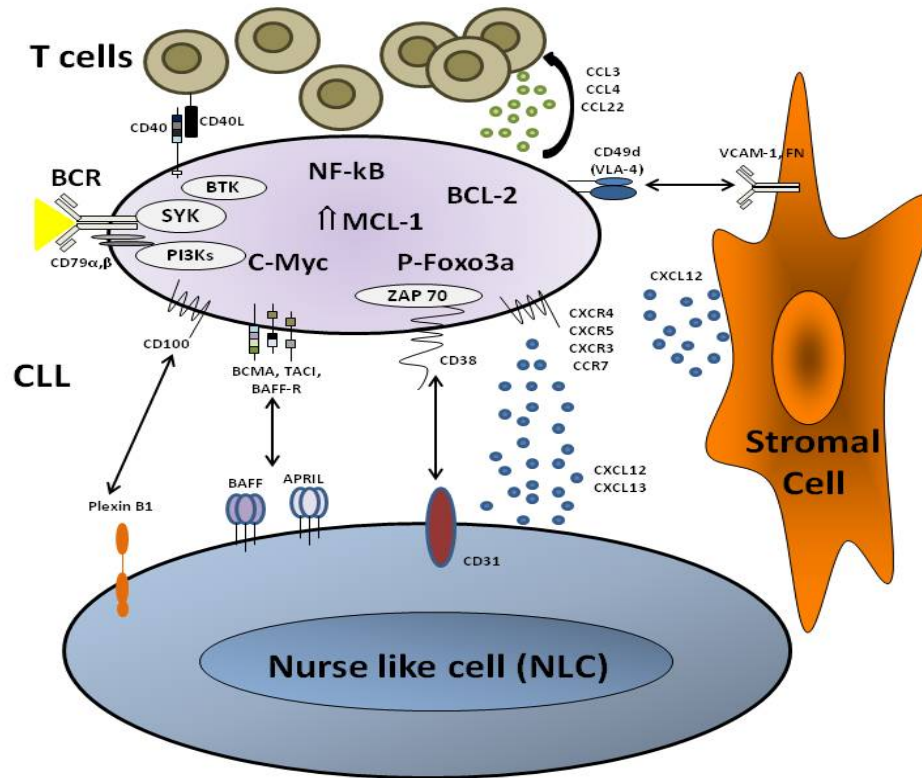


Figure 9 : Le microenvironnement de la leucémie lymphoïde chronique. (Adapté de Burger et al., 2009a)

a) Cellules stromales

Les cellules stromales de la moelle épinière (Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs)) ont été les premières cellules caractérisées comme interagissant avec les cellules de LLC (Lagneaux et al., 1998; Panayiotidis et al., 1996). L'hématopoïèse normale dépend des BMSCs qui pourvoient aux sites d'adhésion et aux facteurs de croissance nécessaire aux précurseurs hématopoïétiques. Dans la LLC, ces cellules ont une fonction similaire et vont créer des niches où les cellules de LLC vont être logées, nourries et protégées des agents cytotoxiques. Les cellules leucémiques ont une grande affinité pour les BMSCs. En co-culture les cellules de LLC vont migrer et adhérer très rapidement aux BMSCs. Cette affinité et la protection apportée par les BMSCs sont dépendante des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ (Lagneaux et al., 1999), mais également de la chimiokine CXCL12/SDF1 α (stromal derived factor 1), exprimée par les BMSCs et ligand du récepteur CXCR4 surexprimé par les cellules de LLC (Mohle et al., 1999; Stamatopoulos et al., 2012). Les BMSCs expriment également de haut niveau de Wnt5a qui va promouvoir la survie des cellules de LLC en stimulant le récepteur tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) exprimé par les LLC (Fukuda et al., 2008).

Les BMSCs ont une origine mésenchymale et sont similaire aux cellules stromales mésenchymales actine (α SMA⁺)-positive (actin(α SMA⁺)-positive mesenchymal stromal cells (MSCs)). Les cellules de LLC vont également interagir avec ces MSCs que l'on retrouve notamment dans les tissus

lymphatiques secondaires. Il est ainsi possible d'observer chez les patients de LLC de très denses infiltrations de cellules leucémiques dans les organes lymphoïdes secondaires suite au recrutement par les MSCs (Ruan et al., 2006). De manière intéressante, les interactions entre cellules de LLC et les MSCs et BMSCs sont bidirectionnelles, activant aussi bien les LLC que les cellules stromales (Ding et al., 2009).

Les cellules dendritiques folliculaires produisent elles aussi des chimiokines comme CXCL13 responsable de la localisation des lymphocytes B dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires (Ansel et al., 2000), et pourraient jouer un rôle dans le recrutement des cellules leucémiques. En effet, les cellules de LLC surexpriment CXCR5, le récepteur à CXCL13 (Trentin et al., 2004). Outre le rôle de ces chimiokines sur la migration des cellules leucémiques dans les organes lymphoïdes secondaires, elles pourraient favoriser la survie des cellules leucémiques via notamment l'inactivation du facteur de transcription FOXO3a (Ticchioni et al., 2007).

b) Les cellules « Nurse-like »

Les cellules « nurse-like » (NLCs) sont des cellules larges, rondes, adhérentes capables d'attirer les cellules de LLC. *In vitro*, elles sont issues de la différenciation des monocytes et peuvent être retrouvées *In vivo* dans la rate et les organes lymphoïdes secondaires (Tsukada et al., 2002). Ces cellules sont capables d'activer le BCR et la voie NF- κ B et entraînent l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes cibles du BCR tels que CCL3 et CCL4. A ce titre, le profil d'expression des gènes des cellules leucémiques induit par les NLCs est sensiblement le même que celui des cellules leucémiques isolées depuis les tissus lymphatiques secondaires (Burger et al., 2009b; Herishanu et al., 2011). Les cellules de LLC interagissent avec les NLCs sur de nombreux mécanismes moléculaires. En effet, les NLCs expriment de nombreuses chimiokines et de nombreux marqueurs. Les plus importants sont CXCL12/SDF1 α (Burger et al., 2000; Stamatopoulos et al., 2012), CXCL13 (Burkle et al., 2007), CD31 (ligand de CD38), plexine B1 (Deaglio et al., 2005; Poggi et al., 2010), BAFF, APRIL (Nishio et al., 2005) et la vimentine (Binder et al., 2010). Elles montrent également un haut niveau de CD68 qui les rendent comparables aux macrophages CD68⁺ associés aux lymphomes (Burger, 2011; Poggi et al., 2010).

c) Les lymphocytes T

Dès les premiers stades de la maladie, on observe une expansion polyclonale de lymphocytes T aussi bien CD4⁺ que CD8⁺ dans le sang périphérique. Ces lymphocytes T sont également retrouvés dans la moelle osseuse et les ganglions périphériques (Ghia et al., 2005a; Serrano et al., 1997).

Les lymphocytes T sont capables de produire des cytokines, comme l'interleukine (IL-4) ou l'interféron (INF α et γ) pouvant induire une résistance des cellules leucémiques à l'apoptose (Mainou-Fowler and Prentice, 1996). Au sein des centres de prolifération pseudofolliculaires, les cellules de LLC peuvent attirer les lymphocytes T CD4⁺ en produisant les chimiokines CCL3, CCL4 (Burger et al., 2009b), CCL22 et CCL17. Les lymphocytes T CD4⁺ sont également capables d'interagir via leur molécule de surface CD40L (CD154) avec les cellules de LLC exprimant la molécule CD40 (Ghia et al., 2002). Cette interaction va notamment augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques, comme la protéine

BIRC5 (Survivine) un inhibiteur des caspases (Granziero et al., 2001). De plus, les cellules de LLC en contact avec les cellules T CD4⁺ expriment à leur surface la molécule CD38 (Patten et al., 2008), dont l'expression est étroitement liée à la capacité de ces cellules à proliférer (Damle et al., 2007). Une étude récente dans laquelle des cellules de LLC sont co-transférées avec des lymphocytes T activées dans des souris immunodéficientes montre une meilleure survie et prolifération des cellules leucémiques et donc l'importance des interactions avec les lymphocytes T dans le développement de la pathologie (Bagnara et al., 2011).

Toutefois l'importance des interactions avec les lymphocytes T reste très discutée. En effet les cellules T peuvent autant stimuler que supprimer les cellules de LLC. De plus, les interactions entre cellules de LLC et lymphocytes T inhibent la capacité de ces dernières à former des synapses immunologiques en induisant des changements dans la transcription des gènes du cytosquelette, inhibant la polymérisation de l'actine et la mobilité des cellules T. Ces modifications se retrouvent également lorsque des cellules T allogéniques saines sont mises en contact avec des cellules leucémiques (Ramsay et al., 2012; Ramsay et al., 2008).

d) Les facteurs solubles et autres récepteurs

- **L'axe CXCR4-CXCL12/SDF1 α** : CXCR4 est le récepteur de la chimiokine CXCL12 sécrétée par les BMSCs. CXCL12 est capable de réguler négativement le niveau d'expression de CXCR4 sur les cellules de LLC. Les cellules de LLC surexpriment CXCR4 et son activation associée à une augmentation de la réponse fonctionnelle au CXCL12 *In vitro* contribuerait à l'infiltration des cellules dans la moelle osseuse (Burger et al., 1999; Calissano et al., 2009). De plus les LLC exprimant de haut niveau de ZAP-70 (Richardson et al., 2006), CD38 (Deaglio et al., 2007) ou de l'intégrine VLA-4 (CD49d) (Brachtl et al., 2011) montrent un potentiel migratoire plus important en présence de CXCL12.
- **L'axe CXCR5-CXCL13** : CXCR5 est le récepteur de la chimiokine CXCL13 qui régule la migration des lymphocytes vers leur niche dans les follicules lymphatiques. Les cellules de LLC expriment fortement de CXCR5. Chez ces cellules, CXCL13 active la migration via les protéines Gi, PI3Ks, p44/42 MAPK et la polymérisation de l'actine (Burkle et al., 2007). Les LLCs sécrètent CXCL13 et participent ainsi au positionnement et à l'infiltration des cellules de LLC dans les tissus lymphoïdes.
- **BAFF et APRIL** : BAFF (B-cell activating factor of the TNF family aussi connu sous le nom de BlyS) et APRIL (a proliferation inducing ligand) appartiennent à la famille du TNF (tumor necrosis factor). Ces molécules sont des protéines homotrimériques de classe II transmembranaires, mais peuvent également être retrouvées sous forme soluble suite au clivage de la forme transmembranaire. On retrouve par exemple, des taux élevés d'APRIL circulant dans le sérum de patients LLC en comparaison à des sujets sains (Planelles et al., 2007). Ces ligands se lient au récepteur de la famille du TNF BCMA (B-cell maturation antigen) et TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor). BAFF peut également se lier

au BAFF receptor (BAFF-R) (Haiat et al., 2006). Ces trois récepteurs sont retrouvés sur les cellules de LLC (Kern et al., 2004) alors que BAFF et APRIL sont exprimés par les NLCs (Nishio et al., 2005). La liaison de ces molécules induit l'activation de la voie NF- κ B (Endo et al., 2007), l'expression de la protéine anti-apoptotique MCL-1 (Nishio et al., 2005) et celle de c-MYC (Zhang et al., 2010b), aboutissant à l'augmentation de la survie cellulaire. De façon intéressante, il fut montré en 2002, par l'équipe de John Reed, que la co-culture de cellules de LLC avec des cellules dendritiques primaires ou une lignée de cellules dendritiques augmentait la survie des cellules de LLC via l'augmentation de l'expression de la protéine MCL-1 ; ce mécanisme faisant intervenir la molécule de surface CD44 (Pedersen et al., 2002).

- **Ang2 et VEGF** : Il existe une néovascularisation anormale de la moelle osseuse et des ganglions périphériques chez les patients atteints de LLC. En effet, les cellules de LLC sont capables de sécréter de l'Ang2 (Angiopoietin 2) et du VEGF (vascular endothelial growth factor). Cette production est encore plus forte en condition d'hypoxie (Maffei et al., 2010). Ce mécanisme contribue probablement à la vascularisation de la tumeur. Les cellules leucémiques expriment les récepteurs membranaires aux VEGF, mais leur production et utilisation de manière autocrine ne suffit pas à prévenir l'apoptose des cellules de LLC *In vitro*. Toutefois, les BMSCs sécrètent également du VEGF et ce en quantité bien plus importantes que les LLC. Ces cellules favorisent ainsi la vascularisation de la tumeur leucémique et à la survie des cellules de LLC (Gehrke et al., 2011).

e) La prolifération cellulaire dans la LLC

La LLC a été très longtemps considérée comme une pathologie présentant un défaut d'apoptose cellulaire conduisant à l'accumulation des cellules leucémiques dans le sang. Toutefois, il a depuis été observé l'existence d'une capacité de prolifération de certaines cellules leucémiques importante dans le développement de la maladie.

Les cellules de LLC expriment les molécules CD38, le marqueur KI67, ou encore la cycline D1, dont les expressions sont étroitement liées à la capacité de ces cellules à proliférer (Damle et al., 2007). Ce compartiment prolifératif a été mis en évidence et quantifié *in vivo* utilisant une technique de marquage à l'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) (Messmer et al., 2005). Cet isotope se retrouve dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en division permettant d'évaluer le taux de croissance d'un clone leucémique. Celui-ci est compris entre 0,1% et plus de 1% par jour (Messmer et al., 2005) démontrant que les cellules de LLC sont pourvues d'une composante proliférative importante.

Ces données sont également à rapprocher des données issues de l'étude des télomères dans la LLC. Une caractéristique intéressante des LLC est l'hétérogénéité en termes de longueur des télomères et l'activité télomérase (hTERT). Les télomères sont des structures nucléoprotéiques qui se trouvent à l'extrémité des chromosomes. Lors de chaque division cellulaire, les télomères s'érodent jusqu'à atteindre une taille critique qui déclenche alors une entrée en sénescence de la cellule. La structure et les fonctions des télomères dépendent des enzymes télomérases (hTERT, hTR, dyskérine) pour l'élongation, du complexe shelterin (TRF1, TRF2, TIN2, hRAP1, TPP1, POT1) qui régule la longueur

des télomères et les protège contre la dégradation et la fusion, et d'un ensemble d'éléments multifonctionnels, notamment RPA1, hEST1A, KU70/KU80 et le RAD50-MRE11-NBS1 (Gilson and Londono-Vallejo, 2007). La LLC résulte de l'accumulation progressive d'un clone leucémique présentant une faible activité télomérase au début de la maladie (Counter et al., 1995) et une activité augmentée aux stades avancés de la maladie (Damle et al., 2004). Des télomères courts sont associés à certains facteurs de mauvais pronostic et à certaines anomalies génétiques comme les délétions 11q ou 17p, l'expression de ZAP-70 ou encore le statut non-muté des Ig. Dans ces cellules présentant des télomères courts, l'expression de la hTERT, la dyskérine, POT1, et hEST1A sont considérablement réduites (Poncet et al., 2008). L'ensemble de ces données suggère d'une part que les cellules de LLC sont pourvues d'une composante proliférative, et d'autre part que la diminution de l'activité télomérase et de sa régulation ainsi que les changements dans la composition des protéines télomériques sont impliqués dans la pathogénie de la LLC.

II.D.3. Le défaut d'apoptose dans la LLC

L'anomalie majeure dans la physiologie de la LLC est une dérégulation du processus d'apoptose. Cette résistance à l'apoptose s'avère tout autant être due au microenvironnement cellulaire qu'aux altérations intrinsèques de la cellule de LLC (Packham and Stevenson, 2005).

Les deux voies d'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort TRAIL-R et FAS (CD95) sont altérées dans la LLC. Cette résistance serait due en partie à la surexpression de molécules anti-apoptotiques, comme par exemple la protéine XIAP, protéine de la famille des IAPs (Loeder et al., 2009) ou la surexpression des protéines c-FLIP et PED (phosphoprotein enriched diabetes), décrites comme des protéines à domaine de mort (DD), interférant avec l'activation de la caspase 8 et le complexe de signalisation du récepteur de mort TRAIL-R (Garofalo et al., 2007; MacFarlane et al., 2002). La surexpression de la protéine TOSO aussi connue sous le nom de FAIM3 (Fas inhibitory molecule 3), en se liant au domaine FADD, grâce à sa partie c-terminale, induit l'inhibition de la signalisation FAS et expliquerait la résistance à l'apoptose induite par FAS. L'expression de TOSO dans les cellules de LLC-B est induite suite à l'activation du BCR et son expression est associée à des facteurs de mauvais pronostiques dont le statut mutationnel des Ig (Pallasch et al., 2008; Proto-Siqueira et al., 2008).

La cellule leucémique de LLC est également caractérisée par une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2. Cette surexpression peut être le fait de plusieurs mécanismes :

- La région promotrice du gène codant pour BCL-2 fréquemment hypométhylée (Hanada et al., 1993).
- La délétion 13q14 contenant un cluster de deux miRNA 15-A/16-1 dont la délétion a été liée à la pathogénie de la LLC et qui sont capables de réguler négativement l'expression de nombreuses protéines du cycle mais également des régulateurs de l'apoptose incluant BCL-2 (Calin et al., 2008; Klein et al., 2010).

De plus, le profil d'expression des gènes de la famille BCL-2 est plutôt en faveur d'une signature anti-apoptotique. En effet, le ratio BCL-2/BAX est corrélé avec la réponse aux drogues *in vitro* mais

également à la réponse des patients aux chimiothérapies. Par contre, aucune corrélation n'a été trouvée avec le stade de la maladie (Pepper et al., 1998; Saxena et al., 2004).

Une autre protéine anti-apoptotique de la famille BCL-2, MCL-1, est surexprimée dans les cellules de LLC, et est inversement corrélée à la réponse aux chimiothérapies in vitro ou à l'échec de réponse des patients à différents agents chimiothérapeutiques (Awan et al., 2009; Kitada et al., 1998). De plus, une étude sur 185 patients a permis de mettre en évidence une relation entre l'expression de MCL-1 et d'autres marqueurs pronostiques comme le stade de la maladie, le statut mutationnel des Ig, l'expression de ZAP-70 ou encore de la molécule CD38 (Pepper et al., 2008).

D'autres régulateurs classiques de l'apoptose comme la protéine p53 et ATM, senseurs clés des dommages à l'ADN, sont soit mutés, soit leur région codante est délétée chez 7%-9% des patients (Wang et al., 2011b).

II.E. Traitement de la leucémie lymphoïde chronique

Malgré les progrès accomplis durant ces dernières années sur la compréhension de la LLC et les progrès accomplis en termes de traitement, cette maladie reste toujours incurable. Toutefois de nouveaux traitements sont étudiés en essais cliniques pour améliorer la durée de vie des patients atteints ou mieux traiter les patients présentant des résistances aux traitements conventionnels.

II.E.1 Traitement standard

Le traitement par chimiothérapies n'est pas utilisé en routine dans la LLC. En effet, pour les stades précoces de la LLC ou les patients présentant une forme stable de la maladie, l'abstention thérapeutique est conseillée. Certains n'auront même jamais besoin d'un traitement. Les traitements ne sont démarrés que chez les patients présentant des stades avancés, symptomatiques ou agressifs de la pathologie. Le choix du traitement se fera par le clinicien en fonction du stade, de l'activité de la maladie, de l'âge du patient et de l'existence éventuelle de facteurs de co-morbidités.

Durant des années, le chlorambucil (en combinaison ou non avec des stéroïdes) constituait le traitement de prédilection pour les patients présentant des formes agressives ou des stades avancés de la maladie (Dighiero et al., 1998). Il n'est plus aujourd'hui le traitement de première intention et n'est désormais utilisé que chez les patients âgés présentant des facteurs de co-morbidités.

Actuellement, les patients qui nécessitent un traitement sont soignés à l'aide d'analogues à la purine, la fludarabine, qui s'est vu depuis utilisé en combinaison avec un agent alkylant, la cyclophosphamide (traitement FC). Ce traitement a une grande efficacité de réponse, pouvant même aller à une rémission complète chez le patient (Eichhorst et al., 2006; Eichhorst et al., 2009; Robak et al., 2010).

L'addition à ce traitement de base d'anticorps monoclonaux, notamment du rituximab, a montré des résultats encore plus efficaces. Ce traitement dit R-FC est administré aux patients jamais traités ainsi

qu'aux patients réfractaires aux autres traitements ou en rechute, jeunes ou physiquement en bonne santé. Il représente un risque chez les patient plus âgés du fait des risques de myélosuppression et des autres effets secondaires (Hallek et al., 2010; Robak et al., 2007).

Des essais cliniques récents ont également présenté des résultats prometteurs dans l'utilisation du rituximab et cyclophosphamide avec la pentostatine, un inhibiteur de l'adénosine désaminase ou la clabidine, un agent alkylant pouvant être utilisé à la place de la fludarabine (Kay et al., 2007; Robak et al., 2010). Un autre agent alkylant qui a également une action d'analogue à la purine, la bendamustine a montré un effet chimiothérapique important dans les LLC (Knauf et al., 2009). Il est depuis fréquemment utilisé chez les patients réfractaires aux autres traitements ou en rechute.

Un autre anticorps monoclonal anti-CD20, l'alemtuzumab est utilisé en première intention dans le traitement des patients présentant une délétion 17p. Il n'est utilisé qu'en deuxième ou troisième intention pour les patients ne présentant pas cette délétion (Gritti et al., 2012; Hillmen et al., 2007).

II.E.2 La transplantation de cellules souches

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques représente la seule méthode curative de la LLC. Mais ce type d'opération très lourde peut entraîner de nombreux effets secondaires chez le patient qui peut rejeter la greffe, voire décéder. Elle n'est donc utilisée que chez les patients jeunes résistant au traitement à la fludarabine ou faisant des rechutes précoces avec un statut muté pour le gène *TP53* (Dreger et al., 2007).

II.E.3 Les nouveaux agents anti-cancéreux pour la LLC.

Ces dernières années de nouvelles thérapies pour la LLC se sont développées et sont basées sur de nouveaux anticorps monoclonaux, des agents ciblant des membres de la famille BCL-2, les récepteurs impliqués dans les voies de survie cellulaire, des oligonucléotides anti-sens ou des agents antiangiogéniques.

- **GA101 (Obinutuzumab)** : Anti-CD20 humanisé de deuxième génération, capable d'entraîner l'apoptose des cellules de LLC (Goede et al., 2013).
- **Oblimersen (OBL)** : Oligodéoxyribonucléotide anti-sens capable de bloquer la transcription de la protéine BCL-2 (O'Brien et al., 2009a).
- **Obbatoclox mesylate (GX15-070) et Navitoclax (ABT-263)** : BH3-mimétiques, le premier est un antagoniste de toute la famille BCL-2 re-sensibilisant à l'apoptose via TRAIL-R (O'Brien et al., 2009b). Le second est sélectif de BCL-2 et relié aux protéines BCL-x_L et BCL-w (Roberts et al., 2012).
- **Ibrutinib (PCI-32765)** : Inhibiteur de BTK, il va permettre l'inhibition de la voie du BCR. Il est très bien toléré par les patients et n'entraîne pas de myélosuppression (Burger, 2014).
- **Idelalisib (CAL-101 (GS-1101))** : Inhibiteur de la signalisation PI3K, il s'est montré très efficace sur des patients présentant une délétion 17p (Macias-Perez and Flinn, 2013).

- **Otlertuzumab (TRU-016)** : C'est un anticorps monoclonal anti-CD37 humanisé. Il a la particularité d'entraîner l'apoptose des cellules leucémiques sans cytotoxicité complémentaire. Les sujets sains traités à l'otlertuzumab n'ont montré aucun effet secondaire (Gopal et al., 2014).
- **Alvocidib (flavopiridol, EFC6663)** : Flavone synthétique, c'est un inhibiteur des cyclin dependent kinases (CDKs) 1,2 et 9. Il induit une apoptose p53-indépendante, mais il s'accompagne d'effets secondaires très fort avec une lyse tumorale, des infections et des diarrhées (Lin et al., 2009).
- **Lenalidomide (Revlimid)** : Immunomodulateur utilisé dans le myélome multiple, il a montré une bonne efficacité dans la LLC. Il est bien supporté par des patients âgées atteints de forme symptomatique de la LLC (Badoux et al., 2011).

III. Les mécanismes de mort cellulaire

La mort cellulaire en tant que mécanisme régulé joue un rôle important dans de très nombreux processus biologiques allant de l'embryogénèse à l'immunité. Si ces mécanismes sont dérégulés, un excès de mort cellulaire ou au contraire l'inhibition de ces mécanismes peut entraîner l'apparition de diverses pathologies telles que des cancers, des problèmes d'auto-immunité ou des pathologies neurodégénératives. La mort cellulaire a ainsi été beaucoup étudiée et il est possible de définir différents mécanismes au sein d'une cellule conduisant à sa mort.

III.A. L'apoptose

L'apoptose est un programme de mort cellulaire qui participe à l'embryogénèse et à l'homéostasie cellulaire du corps humain. 60 billions de cellules meurent chaque jour par apoptose dans le corps humain. La première définition de l'apoptose date des années 1960 où John Kerr décrit des hépatocytes mourant après ischémie avec une morphologie originale, différente de la nécrose. Le terme d'apoptose n'a été introduit qu'en 1972 (Kerr et al., 1972). L'apoptose se caractérise au niveau morphologique par une rétraction des pseudopodes, un détachement du substrat, une diminution du volume cellulaire (pyknosis), une condensation définitive de la chromatine des noyaux (pyknocytose), une fragmentation nucléaire (karyorrhexis) et la formation de corps apoptotiques qui sont dégradés par les cellulaires phagocytaires *in vivo*. Durant ces processus, la membrane plasmique reste intègre (Kroemer et al., 2009). La caractérisation biochimique de l'apoptose comprend une activation des caspases, une perméabilisation de la membrane plasmique mitochondriale (MOMP) et une exposition du phospholipide phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique.

Les protéines clé de l'apoptose sont les caspases (cysteine aspartyl-specific proteases), une classe de cystéine protéases capables de cliver des sites présentant un résidu aspartique en C-terminal. Elles jouent un rôle critique dans l'initiation (caspases 2, 8, 9 et 10) et dans l'exécution de l'apoptose (caspases 3, 6 et 7). Une fois activées, les caspases vont cliver des substrats tel que la poly-ADP ribose polymérase-1 (PARP-1) et la DNase inhibitrice de l'activité des caspases. S'en suit alors une MOMP qui est mise en évidence par la dissipation du potentiel trans-membranaire mitochondrial, la génération de ROS, la diminution de la production d'ATP et le relargage dans le cytoplasme de molécules mitochondriales (Kepp et al., 2011).

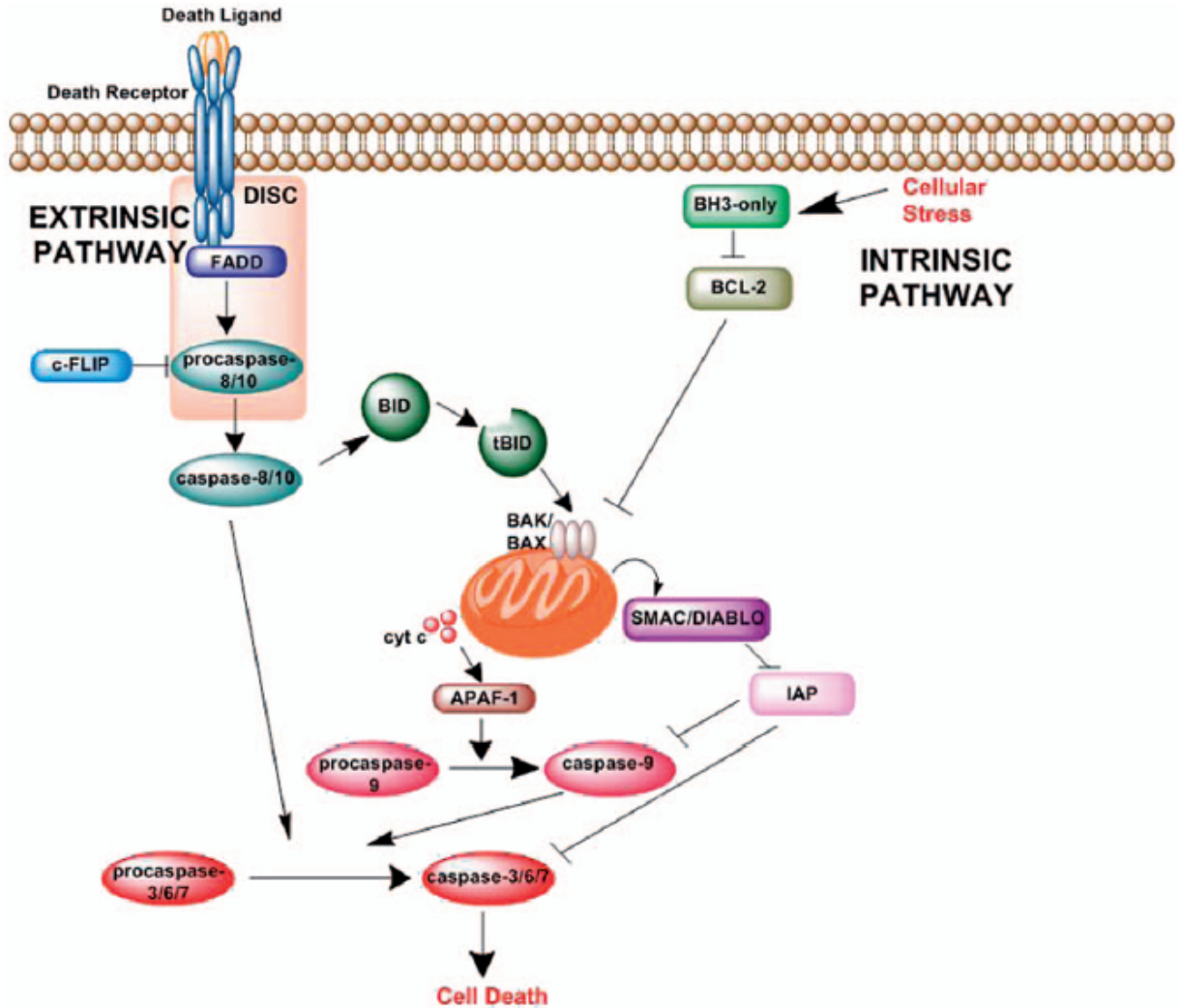


Figure 10 : Les voies de l'apoptose. (Tirée de Zaman et al., 2014)

Il existe deux grands types d'apoptose : l'apoptose extrinsèque et intrinsèque (Figure 10).

L'apoptose extrinsèque : elle est induite par des signaux de stress extracellulaires reçus et transmis par des récepteurs spécifiques transmembranaires appelés récepteurs de mort cellulaire. Ces récepteurs font parti de la famille des récepteurs de mort cellulaire TNF (tumor necrosis factor). Les ligands tumor necrosis factor α (TNF- α), FAS/CD95 ligand (FASL/CD95L/TNFSF6) et TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL/APO2L/TNFSF10) qui lient respectivement les récepteurs TNF (TNFR1), FAS/ CD95 (FAS/CD95/TNFRSF6), DR4 (DR4/TNFRSF10A) et DR5 (DR5/TNFRSF10B) vont enclencher les mécanismes d'apoptose lorsqu'ils sont présents en grande concentration. A l'inverse, les récepteurs de dépendance comme les récepteurs à la netrine induisent au contraire une apoptose lorsque la concentration de leur ligand spécifique est en dessous d'une valeur seuil (Galluzzi et al., 2012).

La voie de signalisation la mieux connue de l'apoptose est celle de FAS/FASL. La fixation de trimères de FASL induit un changement de conformation de FAS qui permet l'assemblage d'un complexe dynamique multiprotéique au niveau de sa région intracytosolique appelée death domain (DD). Tous les récepteurs de mort cellulaire partagent le même domaine DD. Les protéines recrutées au niveau du domaine DD de FAS sont RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1), FADD (FAS-associated protein with a death domain), cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins), E3 ubiquitine ligase et procaspase 8 ou procaspase 10. Ce complexe protéique appelé death inducing signaling complex (DISC) régule l'activité de caspase 8 ou caspase 10. La protéine c-FLIP et ses multiples isoformes sont des homologues de la caspase-8 qui ont perdu cette activité caspase. Ils peuvent prendre la place de la caspase 8 dans le complexe DISC et inhiber l'activité de ce dernier (Galluzzi et al., 2012; Zaman et al., 2014).

L'apoptose extrinsèque met toujours en jeu des récepteurs de mort cellulaire ou des récepteurs de dépendance. Elle est toujours caspase-dépendante et peut donc être empêchée par des inhibiteurs chimiques pan-caspases comme le QVD ou le Z-VAD. Hormis dans les lymphocytes, elle dépend de la perméabilisation de la membrane plasmique des mitochondries.

L'apoptose intrinsèque : Elle est favorisée par divers stress cellulaires : stress oxydatif, altération de l'ADN, influx calcique cytosolique, exocytotoxicité du glutamate dans le système nerveux, accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique. Lorsque ces stress sont trop importants, on observe une MOMP. Cette voie est régulée par les protéines de la famille BCL-2, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK. Lors de l'induction de cette voie, les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 vont être inhibées par les protéines BH3-only (BIM, BIK, NOXA, PUMA, BID, BAD, BMF) et permettre ainsi l'oligomérisation de BAX et BAK. Ensemble, ils vont permettre la formation d'un complexe multi-protéique issu de la membrane mitochondriale interne, le permeability transition pore complex (PTPC). L'ouverture prolongée du PTPC augmente brutalement la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux ions et aux molécules de faibles poids moléculaire provoquant un gonflement osmotique de la matrice mitochondriale et une rupture de la membrane externe mitochondriale. Ceci aura pour effet de permettre le relargage dans le cytosol de SMAC/DIABLO et du cytochrome c. La MOMP induit la formation de l'apoptosome, composé du cytochrome c, d'APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) de deoxyadenosine triphosphate (dATP) et de la procaspase 9. SMAC de son côté va inhiber les protéines IAP pour prévenir l'inhibition de la procaspase 9 par ces protéines. L'apoptosome active les caspases 9 et 3 qui provoquent une mort apoptotique dépendante des caspases. La MOMP entraîne également une apoptose non caspase-dépendante en libérant dans le cytosol les protéines AIF (apoptose inducing factor), endonuclease G (ENDOG) et la serine protéase HTRA2 (high temperature requirement protein A2) qui provoquent la dégradation de l'ADN nucléaire et du cytosquelette (Galluzzi et al., 2012; Zaman et al., 2014).

La MOMP est aussi délétère par la dissipation du potentiel trans-membranaire mitochondrial, la génération de ROS (reactive oxygen species) et la diminution de production d'ATP. Elle constitue donc le point de non retour de la cascade biochimique conduisant à une apoptose intrinsèque caspase dépendante et/ou caspase indépendante.

Les voies intrinsèques et extrinsèques ne sont pas indépendantes. En effet, dans les lymphocytes, la caspase 8 active directement caspase 3 et la cascade de caspases effectrices de l'apoptose sans dépendre des mitochondries. Dans les autres types cellulaires, caspase 8 clive BID (BH3-interacting domain death agonist) produisant un agent perméabilisant de la membrane plasmique des mitochondries, tBID (truncated BID) (Galluzzi et al., 2012; Zaman et al., 2014). La libération de protéines mitochondriales dans le cytosol forme l'apoptosome, qui va entraîner dans certaines conditions une activation des caspases et une apoptose. Les deux voies achèvent leur signalisation par l'activation des caspases 3, 6 et 7 qui vont cliver leurs substrats et conduire à la destruction de la cellule.

L'apoptose est dérégulée dans les cancers. Le système hématopoïétique qui présente un haut renouvellement cellulaire, est particulièrement sensible à une dérégulation de ce mécanisme. Plusieurs causes peuvent entraîner cette dérégulation. La plus fréquente est la dérégulation de l'expression de membres de la famille anti-apoptotique BCL-2. Par exemple, la protéine BCL-2 est ainsi retrouvée surexprimée dans les lymphomes non-hodgkiniens suite à la translocation t(14;18) (Reed, 2008), dans la LLC suite à une hypométhylation de son gène ou à une perte de micro-ARNs (Calin et al., 2008; Hanada et al., 1993) ou dans les myélomes après une translocation t(11;14) (Bodet et al., 2011). La surexpression de BCL-2 dans ces cancers est fréquemment associée à un mauvais pronostic mais également à des résistances aux traitements (Campos et al., 1993; Saxena et al., 2004; Yunis et al., 1989). D'autres membres de cette famille ont été identifiés comme étant surexprimés et causant des résistances dans les pathologies hématopoïétiques. C'est le cas notamment de MCL-1 dans la LLC (Awan et al., 2009).

Une autre cause est la surexpression des protéines de la famille inhibitor of apoptosis (IAP) qui inhibent les caspases terminales du déclenchement de la mort cellulaire. De la même manière que la famille BCL-2, la surexpression des membres de cette famille va être marqueur de mauvais pronostic et participer à la résistance aux traitements. C'est le cas avec cIAP2 qui est surexprimée dans les lymphomes MALT suite à la translocation t(11;18)(q21;q21) (Dierlamm et al., 1999), dans les leucémies T de l'adulte suite à l'action de l'oncoprotéine TAX et l'activation de la voie NF- κ B (Waldele et al., 2006), dans les leucémies myéloïdes aiguës où l'on retrouve également une surexpression de XIAP (Sung et al., 2009; Tamm et al., 2004) et dans la LLC où la surexpression de XIAP, cIAP1 et cIAP2 sont marqueurs de mauvais pronostics (Grzybowska-Izydorczyk et al., 2010).

III.B. L'autophagie

L'autophagie est un mécanisme lysosomal-dépendant qui dégrade des vésicules diverses provenant des organelles (Mizushima and Komatsu, 2011). Lors de ce mécanisme, se constitue dans le cytoplasme l'autophagosome, structure isolée à partir de la double membrane cellulaire riche en lipides et protéines cytosoliques. Les autophagosomes matures vont fusionner avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes et pour conduire au catabolisme du matériel cytoplasmique encapsulé dans l'autophagosome (Figure 11). Les hydrolases lysosomales dégradent la membrane interne et le contenu de l'autophagosome. Les macromolécules obtenues sont alors exportées dans le cytoplasme où elles participent à la production d'énergie ou à la synthèse de nouveaux métabolites. Ce mécanisme complexe est régulé par les protéines ATG. L'activité autophagique d'une cellule est démontrée par la présence d'autophagosomes et d'autophagolysosomes en microscopie électronique et par la détection de la lipidation du microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3 ou LC3). Le LC3 II participe à l'élongation des vésicules autophagiques (Kepp et al., 2011).

Chez un organisme, l'autophagie est un processus crucial impliqué dans le développement, l'immunité et l'âge (Choi et al., 2013), mais est aussi relié à une forme de mort appelée mort autophagique ou mort cellulaire de type II. L'autophagie a été décrite en 1973 par Schweichel et Merker (Schweichel and Merker, 1973) comme un mécanisme essentiel de mort cellulaire. Cependant dans la plupart des cas, l'autophagie semble plutôt accompagner la mort qu'en être la cause (Das et al., 2012). L'autophagie constitue plus fréquemment un mécanisme de survie face à un stress métabolique et restaure l'homéostasie cellulaire. Son inhibition aggrave la mort cellulaire dans la plupart des cas. Activer l'autophagie permet de lutter contre des phénomènes de vieillissement, de dégénérescence et d'ischémie. Inhiber l'autophagie permet de sensibiliser des tumeurs à la radiothérapie ou à d'autres chimiothérapies (Galluzzi et al., 2012).

L'autophagie en tant que mort n'a été démontrée qu'*in vitro*. On la retrouve ainsi dans les cellules déficientes en BAX et BAK où les molécules clés de l'autophagie BECLIN-1 et ATG5 induisent une mort spécifique (Shimizu et al., 2004) ou dans le cas de l'inhibition des caspases, s'accompagnant d'une augmentation des ROS (Lamy, 2013; Yu et al., 2006). Dans ce cas également la surexpression de BECLIN-1 dans les cellules est capable d'induire la mort par autophagie (Liu et al., 2013a; Pattingre et al., 2005).

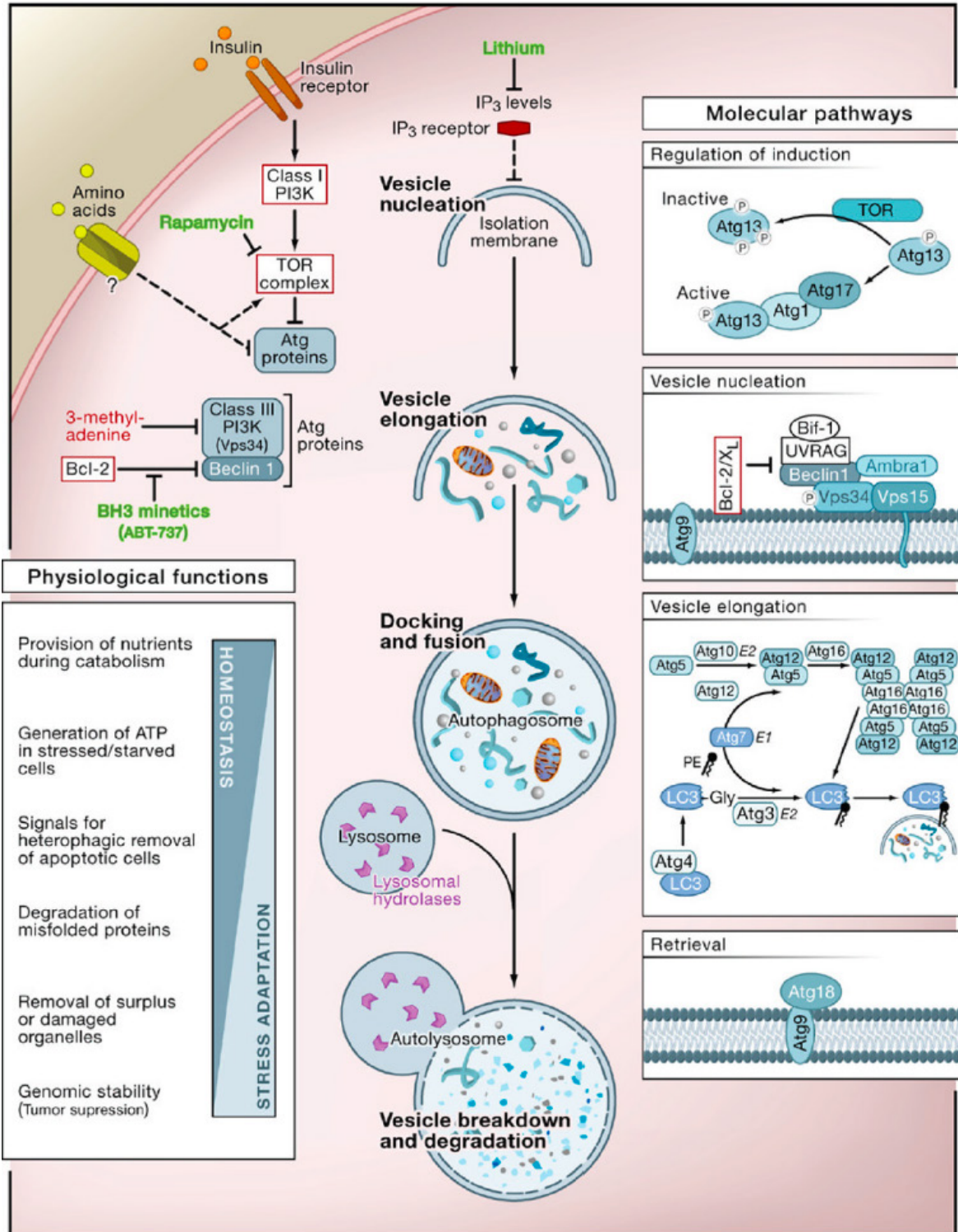


Figure 11 : L'autophagie. (Tiré de Kepp et al., 2011)

III.C. La nécrose cellulaire.

La nécrose cellulaire a longtemps été considérée comme un mécanisme passif, accidentel et pathologique. On sait actuellement que ce mécanisme de mort cellulaire peut être régulé et peut constituer une mort cellulaire programmée physiologique (Vandenabeele et al., 2010). La nécrose correspond à la mort cellulaire de type III de la classification de Schweichel et Merker (Schweichel and Merker, 1973).

Anciennement la nécrose était définie comme une mort ne présentant pas d'aspect morphologique d'autophagie ou d'apoptose. Depuis, des critères morphologiques ont été définis : cytoplasme translucide, gonflement des organelles cytoplasmiques, condensation de la chromatine en amas irréguliers, gonflement cellulaire (oncosis) entraînant une rupture précoce de la membrane plasmique (Kroemer et al., 2009). Il existe peu de marqueurs biochimiques spécifiques de la nécrose cellulaire (Vandenabeele et al., 2010). En effet, nombre des processus rencontrés dans la nécrose se retrouvent également dans les autres morts cellulaires. Ainsi la perméabilisation des membranes lysosomales et mitochondriales, la génération excessive de ROS, la consommation d'ATP, l'activation de protéases non-caspases comme les cathepsines et la calpaïne et l'augmentation de l'influx calcique intra cellulaire sont également détectés dans l'apoptose. A l'inverse, la MOMP et la présence d'HMGB1 (high-mobility group protein B1) et de CYPA (ou peptidylprolyl isomerase A, PPIA) dans le milieu extracellulaire sont très évocatrices d'un mécanisme de nécrose cellulaire.

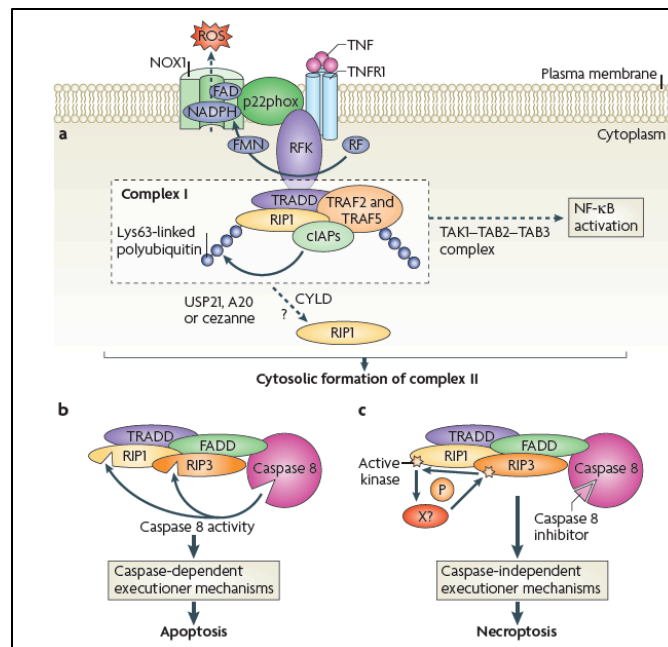


Figure 12 : Induction de la mort par le TNF récepteur. L'interaction du TNF et du TNFR conduit à la formation d'un complexe I qui va entraîner soit une survie, soit une mort cellulaire par apoptose ou nécrose en fonction de l'activation ou de l'inhibition de la caspase 8 par des stimuli externes.

L'activation des récepteurs de mort cellulaires entraîne généralement une apoptose mais dans certaines conditions et sur certains types cellulaires, elle permet d'initier une nécrose cellulaire programmée. Les récepteurs impliqués sont FAS/CD95, TRAIL-R 1 et 2 et TNF receptor 1 et 2 dont l'implication dans la nécrose est la mieux caractérisée (Figure 12). Le TNF α provoque un changement conformationnel de TNFR lui permettant de recruter au niveau de sa partie cytoplasmique un complexe multi protéique appelé TNFR complexe I (Micheau and Tschopp, 2003). Il comprend les protéines TRAD (TNFR-associated death domain), RIPK1 (receptor-interacting protein kinase), cIAP1 et 2 (cellular inhibitor of apoptosis), TRAF 2 et 5 (TNFR-associated factor). En fonction des stimuli externes et du type de cellules le complexe I va induire une survie cellulaire via la voie NF- κ B ou une mort cellulaire favorisée par le recrutement de ROS-generating NADPH oxydase 1 (NOX1) à la membrane plasmique. Lorsque la voie pro-survie de NF- κ B est inactivée et RIPK1 déubiquitinée, le TNFR1 est internalisé dans le cytoplasme cellulaire, menant à l'assemblage d'un death inducing signaling complex (DISC), ici appelé TNFR complexe II. Il est composé de TRADD, FADD, caspase 8, RIPK 1 et 3. Ce complexe II peut induire une apoptose ou une nécrose cellulaire. La caspase 8 va entraîner une apoptose en inhibant par clivage RIPK1 et 3 et en activant la cascade des caspases de l'apoptose. Au contraire, si la caspase 8 est inhibée, RIPK 1 et 3 sont phosphorylées et induisent une nécrose cellulaire. RIPK 1 et RIPK3 vont constituer le nécrosome en association avec d'autres protéines comme MLKL (mixed lineage kinase domain-like) et PGAM5 (mitochondrial phosphoglycerate mutase protein phosphatase) (Wang et al., 2012). L'augmentation des ROS et les calciums ionophores peuvent également induire une nécrose cellulaire intrinsèque. Cette voie est dépendante de PGAM5, mais indépendante des récepteurs de mort cellulaire et des protéines RIPK 1 et 2 (Wang et al., 2012). PGAM5 est activé par les ROS, via KEAP-1 (Lo and Hannink, 2008) qui est une protéine sensible aux variations du potentiel redox cellulaire.

Le terme de nécroptose désigne stricto-sensu une forme régulée de nécrose active qui implique l'activation de RIPK1 et RIPK3 (receptor-interacting protein kinase) après stimulation du récepteur de mort cellulaire TNFR1 (Duprez et al., 2011). Des travaux récents ont même montré que RIPK3 pouvait être suffisant pour induire une nécroptose, définissant celle-ci comme une nécrose RIPK3 dépendante (Moujalled et al., 2013) (Figure 13).

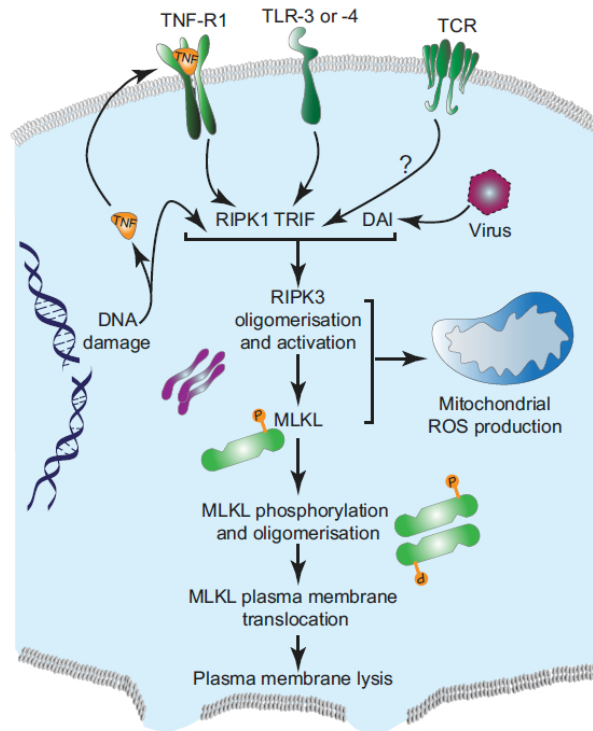


Figure 13 : Mécanismes de la necroptose via RIPK3. Divers stimuli incluant les dommages à l'ADN, les infections virales, l'engagement des récepteurs TCR, TLR ou TNFR, conduisent à l'activation de RIPK3. Ceci conduit à l'oligomérisation de RIPK3 et la phosphorylation en aval de MLKL, ainsi qu'à une production de ROS par la mitochondrie. Une fois phosphorylée, MLKL est transloquée à la membrane et entraîne sa lyse. (Tirée de Tait et al., 2014)

Necroptose et nécrose s'exécutent de la même manière après le recrutement de RIPK1 et RIPK3 pour former le nécrosome. Ce mécanisme repose sur des perturbations bioénergétiques, la production excessive de ROS, et la perméabilisation des membranes des mitochondries et des lysosomes. L'adénine nucléotide translocase (ANT), protéine de la membrane interne mitochondriale, va échanger l'ATP produit par la mitochondrie avec l'ADP cytosolique. RIPK1 inhibe ANT, ce qui diminue la production mitochondriale d'ATP et modifie le potentiel membranaire mitochondrial. Le nécrosome active alors les sphingomyélinases (SMase) qui libèrent céramides et sphingosine. Il augmente l'influx calcique ce qui active les calpaïnes et la phospholipase A2 plasmique (cPLA2) qui libèrent à partir des phospholipides de l'acide arachidonique, lui-même transformé en hydroperoxydes lipidiques par la lipoxygénase. Sphingosines, calpaïnes et hydroxydes lipidiques provoquent une perméabilisation des membranes lysosomales (LMP) ce qui entraîne une libération des hydrolases acides lysosomales dans le cytoplasme. Le nécrosome augmente le pool d'ion fer libre en activant la dégradation de la ferritine et stimule la glycogénolyse et la glutaminolyse. Le métabolisme oxydatif, le métabolisme des céramides, l'augmentation du pool d'ions fer libres et l'activation de NOX1 produisent des ROS. Les ROS entraînent une peroxydation lipidique, des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le stress oxydatif et l'augmentation du taux de calcium favorisent l'ouverture prolongée du PTPC qui conduit à la

perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP). Le PTPC implique les protéines ANT, VDAC (voltage dependant anion channel), cyclophilin D (CYPD). La MOMP entraîne une libération de molécule mitochondriale cytotoxique. AIF (apoptosis inducing factor) dégrade l'ADN nucléaire ce qui augmente l'activité réparatrice de PARP-1 sur l'ADN mais épuise rapidement les stocks d'ATP (Vandenabeele et al., 2010).

La phosphatase mitochondriale PGAM5 est activée dans les voies intrinsèques et extrinsèques d'induction de la nécrose cellulaire. Elle se lie au nécrosome dans un environnement hydrophobe, probablement au site de fission mitochondriale où est localisée DRP1 (dynamin related protein). PGAM5 active DRP1 en déphosphorylant sa sérine 637 (Wang et al., 2012). DRP1 contrôle la fission mitochondriale (Otera and Mihara, 2011). La translocation de DRP1 du cytoplasme à la mitochondrie provoque une fragmentation des mitochondries, une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial, une génération de ROS et une baisse du niveau d'ATP. Le niveau d'expression de DRP1 est corrélée à la susceptibilité de cellules issues de LLC d'entrer en mort nécrotique (Bras et al., 2007). L'inhibition de DRP1 par des agents chimiques ou des siRNA diminue la nécrose induite par le TNF (Wang et al., 2012).

III.D. La mort indépendante des caspases.

Les événements pro-apoptotiques vont causer une MOMP. La MOMP peut engendrer une mort cellulaire même lors d'une absence d'activation des caspases. Dans ce cas la mort n'est pas une apoptose mais une mort indépendante des caspases (CICD ; caspase-independent cell death) (Tait and Green, 2008) (Figure 14). Celle-ci montre des similarités avec l'apoptose mais présente des critères morphologiques, biochimiques et cinétiques propres. Toutefois les mécanismes exacts de cette mort restent encore à éclaircir.

Deux modèles opposés proposent que la CICD puisse aussi bien être déclenchée par la MOMP que par une perte de fonctions mitochondriales :

- Dans le premier, la MOMP va permettre le relargage des protéines mitochondriales AIF, l'endonucléase G (endo G) et HtrA2/Omi. L'absence de ses protéines a été montrée comme pouvant inhiber la CICD induite dans des cellules (Bahi et al., 2006). Paradoxalement, le relargage depuis la mitochondrie d'AIF et endo G va nécessiter une activité caspase qui sera par la suite inhibée (Arnoult et al., 2003; Munoz-Pinedo et al., 2006).

- Dans le second modèle, la CICD est déclenchée par une perte progressive des fonctions mitochondriales. La perméabilisation de la membrane mitochondriale s'accompagne d'une perte rapide d'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Lartigue et al., 2009), mais également d'un clivage de TIM23, une sous-unité du complexe de translocation de la membrane interne de la mitochondrie, et une dégradation du cytochrome c. Ces événements vont entraîner un arrêt d'activité de la mitochondrie et causer la CICD (Ferraro et al., 2008; Goemans et al., 2008).

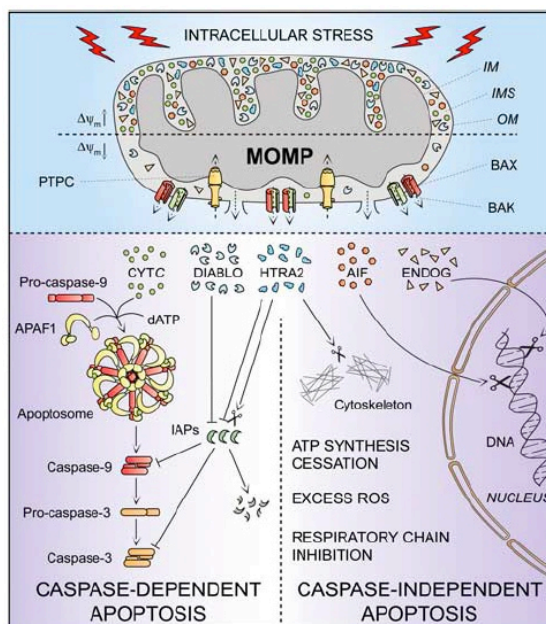


Figure 14 : Les mécanismes de mort induit par la MOMP. En réponse à de multiples stress (dommages à l'ADN, augmentation du Ca^{2+} cytosolique, etc) des signaux de mort cellulaire convergent à la mitochondrie et déclenche une MOMP (mitochondrial outer membrane Permeabilization). La mitochondrie perd son potentiel membranaire et arrête alors de produire de l'ATP. La mitochondrie produit alors des ROS et les protéines contenues dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie sont relâchées dans le cytosol. Elles induiront selon les conditions une apoptose ou une mort indépendante des caspases.

Dans tous les cas, la mitochondrie apparaît comme ayant un rôle actif dans la CICD. Ceci a été confirmé par une étude de Narendra et al., dans laquelle des cellules privées de mitochondries ont survécu plus de 4 jours, temps bien supérieur à la cinétique normale d'exécution d'une CICD (Narendra et al., 2008; Tait et al., 2013). De même, il existe des mécanismes compensatoires à la perte des fonctions bioénergétiques de la mitochondrie. Ainsi, la GAPDH a été identifiée comme pouvant protéger les cellules de la CICD d'une manière dépendant des fonctions glycolytiques de la cellule (Colell et al., 2007; Jacquin et al., 2013).

III.E. Les autres types de mort cellulaire.

D'autres types de mort cellulaire ont été décrits (Galluzzi et al., 2012; Kepp et al., 2011). Ils correspondent à des cas spécifiques, parfois débattus, et partagent souvent des caractéristiques de l'apoptose ou de la nécrose.

- **Catastrophe mitotique** : Mort cellulaire survenant pendant ou peu de temps après un échec de mitose. Les cellules ont des micronoyaux et sont multinuclées. Ce mécanisme est essentiellement oncosuppresseur et surviendrait durant la phase M du cycle cellulaire.

- **Anoikis** : Forme d'apoptose provoquée par le détachement des cellules de la matrice extracellulaire. Elle se caractérise par une perte de l'engagement des intégrines $\beta 1$, une inhibition de l'expression d'EGFR et de ERK1 ainsi qu'une surexpression de la protéine BIM.
- **Entosis** : Une cellule phagocyte une cellule voisine vivante qui va alors mourir par digestion dans le phagosome.
- **Parthanatos** : Mort caspase indépendante, induite par PARP-1 via des facteurs induisant une apoptose se terminant par une lyse de la chromatine médiée par AIF.
- **Autoschizis** : Mort induite par l'association de vitamine C et K3 dans certaines cellules cancéreuses, conduisant à une auto-excision du cytoplasme.
- **Pyroptosis** : Activation de la caspase 1, production d'interleukine1 β , aspect morphologique d'apoptose ou de nécrose. Elle est déclenchée après une infection bactérienne.

IV. Le système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est l'un des principaux systèmes permettant la dégradation des protéines intracellulaires. Chez les eucaryotes, il est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions, dont les plus connues sont la suppression des protéines endommagées et l'homéostasie protéique. La régulation des protéines par ce complexe se fait essentiellement à la suite d'une modification post-transcriptionnelle de la protéine qui se voit ubiquitinée (ou à l'inverse déubiquitinée). L'ubiquitination va contrôler la dégradation des protéines par le protéasome mais va également intervenir dans les mécanismes de réparation de l'ADN, de remodelage de la chromatine, de régulation du cycle cellulaire, dans les mécanismes d'endocytose et dans les voies de signalisation.

IV.A. L'ubiquitine

IV.A.1. Caractérisation de l'ubiquitine.

a) Généralités

L'ubiquitination des protéines a été découverte au début des années 80 comme une modification post-traductionnelle faisant intervenir une petite protéine, l'ubiquitine. Son nom vient du fait qu'elle est localisée dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules des organismes ; elle est dite ubiquitaire. A l'origine, cette modification a été identifiée comme capable de réguler la demi-vie des protéines qui vont subir une rapide dégradation ATP-dépendante par le protéasome. L'ubiquitine était alors connue sous le nom d'APF-1 (ATP-dependant proteolysis factor 1) et Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose l'identifièrent comme une protéine se liant de manière covalente aux protéines qui vont être dégradées par une voie ne sollicitant pas une destruction lysosomale, connue à l'époque pour être la principale méthode de destruction des protéines. Ciechanover, Hershko et Rose caractérisèrent et nommèrent l'ubiquitine dans une série d'articles pionniers dans la découverte du système ubiquitine-protéasome (Ciechanover et al., 1980; Hershko et al., 1980; Hershko et al., 1981; Hershko et al., 1983; Hershko et al., 1984). Ces travaux leur valurent l'attribution d'un prix Nobel en chimie en 2004.

L'ubiquitine est composée de 76 acides aminés pour un poids d'environ 8 500 Da et est extrêmement conservée à travers tous les organismes eucaryotes. Par exemple, l'ubiquitine des levures ne diffère que dans la position de trois acides aminés par rapport à l'ubiquitine humaine alors qu'un billions d'années d'évolution séparent les champignons des humains (Neutzner and Neutzner, 2012). Elle est exprimée sous forme de précurseurs protéiques inactifs, soit en fusion N-terminal avec une autre protéine (souvent des protéines ribosomales), soit en une succession de plusieurs molécules d'ubiquitine fusionnées les unes aux autres. La maturation de l'ubiquitine est assurée par des déubiquitinases (deubiquitinating enzymes (DUB)) qui vont cliver les précurseurs et entraîner l'exposition de la glycine en C-terminal, indispensable à la conjugaison de l'ubiquitine avec ses substrats.

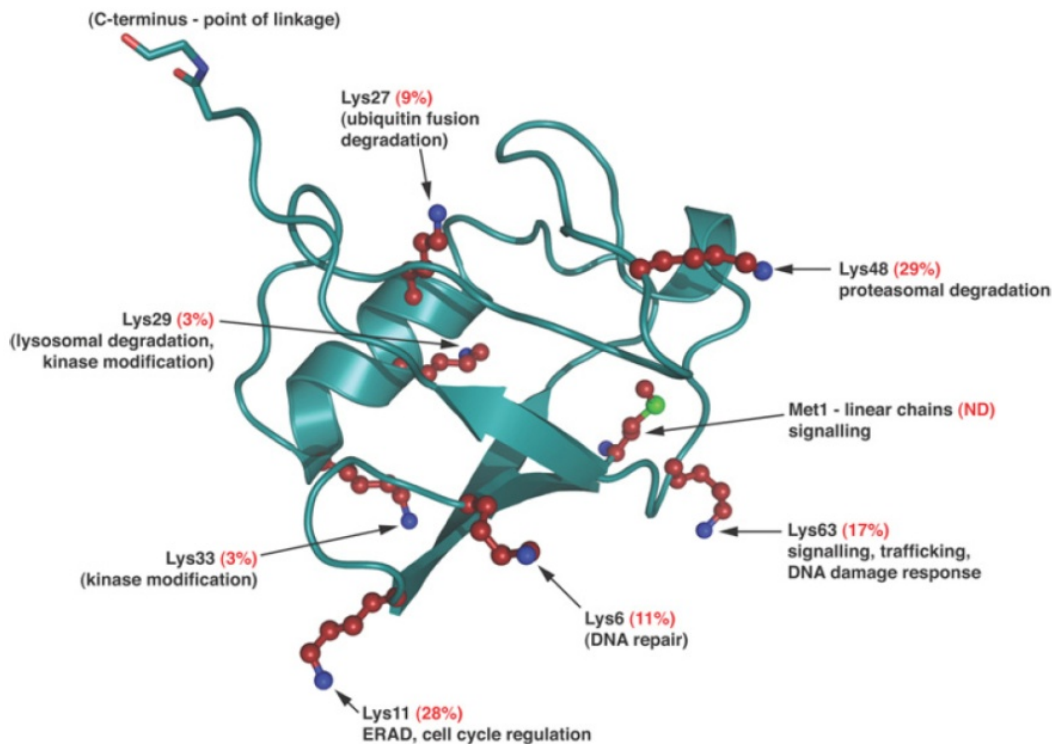


Figure 15 : L'ubiquitine et ses résidus. La structure de l'ubiquitine comporte sept résidus lysine (en rouge avec leur atome de nitrogène en bleu), un résidu méthionine Met¹ (en vert) et une queue C-terminale Gly75-Gly76 impliquée dans les formations isopeptidiques (avec des atomes d'oxygène en rouge et de nitrogène en bleu). (Tiré de Komander, 2009).

b) Activation et conjugaison de l'ubiquitine

L'ubiquitine se lie via son résidu glycine C-terminal au groupement ϵ -amine d'un résidu lysine de son substrat cible. Cette réaction complexe se réalise à l'aide d'une cascade enzymatique nécessitant plusieurs étapes. La première étape ATP-dépendante est l'activation de l'ubiquitine. L'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP va permettre la formation d'un intermédiaire adénylé de l'ubiquitine. S'en suit l'activation du groupement carboxyle de la glycine 76 en C-terminal de l'ubiquitine par un résidu cystéine du site actif d'une enzyme E1. Cette réaction va former une liaison covalente thiol-ester à haut potentiel énergétique. La deuxième étape est une réaction de trans-estérification permettant le transfert de l'ubiquitine sur la cystéine du site actif d'une enzyme de conjugaison E2. Enfin, la troisième étape est la reconnaissance et le transfert de l'ubiquitine sur son substrat par une enzyme E3 ligase. Cette ligase va former une liaison covalente thiol-ester sur un résidu cystéine avec l'ubiquitine avant de la transférer sur son substrat cible (Komander, 2009).

L'ubiquitine peut être son propre substrat de fixation. En effet, l'ubiquitine possède sept résidus lysine (Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys²⁹, Lys³³, Lys⁴⁸ et Lys⁶³) dont le groupement ϵ -amine peut servir, avec le

groupement amine N-terminal, de site accepteur pour une autre ubiquitine (Figure 15). Ceci va permettre la formation de différentes chaînes de poly-ubiquitination qui vont remplir différentes fonctions (Neutzner and Neutzner, 2012).

L'ubiquitine se lie à une protéine en s'attachant à un site spécifique du substrat appelé UBD (Ubiquitin binding domain). Il existe différents UBDs présentant divers motifs de liaison, parmi lesquels ont été identifiés le motif UIM (Ubiquitin-interaction motif), le motif MIU (motif interacting with Ubiquitin) et le motif UBA (Ubiquitin-associated domain). D'autres motifs existent et ont la capacité de lier l'ubiquitine, majoritairement via une liaison hydrophobique autour d'un acide aminé capital, l'Ile⁴⁴. L'interaction de l'ubiquitine à ce simple domaine de liaison suffit à empêcher la fixation de différents effecteurs protéiques sur le même substrat et permet d'enclencher une réponse propre à l'ubiquitination de la protéine (Dikic et al., 2009).

IV.A.2. Les fonctions de l'ubiquitination.

Les différents types de chaînes d'ubiquitination, dont les conformations peuvent être variées, vont permettre des régulations spécifiques suite à l'ubiquitination d'une protéine (Figure 16). L'ubiquitination va ainsi intervenir dans les mécanismes de stabilisation ou destruction d'une protéine mais aussi sur sa localisation intracellulaire.

- **L'ubiquitination en Lys⁴⁸** : L'ubiquitination sur la Lys⁴⁸ est la forme canonique de la poly-ubiquitination et fut longtemps considérée comme la seule existante. Des chaînes de poly-ubiquitination en Lys⁴⁸ de tétramères constituent la taille minimale permettant une reconnaissance par le protéasome (Thrower et al., 2000). Les protéines ubiquitinées en Lys⁴⁸ sont dégradées en quelques minutes. L'ubiquitine elle-même n'est pas dégradée par le protéasome, mais recyclée par l'action d'enzymes de déubiquitination associées au protéasome (Finley, 2009).
- **L'ubiquitination en Lys⁶³** : L'ubiquitination en Lys⁶³ apparaît être non dégradative et participe à l'endocytose, la réponse aux dommages à l'ADN et à la signalisation cellulaire. Le rôle le plus étudié de la poly-ubiquitination en Lys⁶³ est la régulation de la signalisation aux cytokines. Les cytokines telles que TNF α , peuvent éventuellement conduire à l'activation de TAK1, du complexe IKK et à l'activation de NF- κ B. Hors, il s'est avéré que l'activation d'IKK par TAK1 est un mécanisme Lys⁶³ dépendant (Deng et al., 2000). C'est également le cas d'autres protéines comme RIPK1, IRAKs et le récepteur TRAF (Deng et al., 2000; Ea et al., 2006; Ordureau et al., 2008). La découverte d'une DUB Lys⁶³-spécifique, CYLD, impliquée dans les voies de signalisation NF- κ B, Wnt et IRF, souligne le rôle important de cette ubiquitination dans la transduction de ces signaux (Massoumi, 2011). L'endocytose est également reliée à la reconnaissance des récepteurs de surface ubiquitinés par la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Initialement, la mono-ubiquitination a été découverte comme impliquée dans ce mécanisme. Depuis, plusieurs récepteurs de surface ont été identifiés comme poly-ubiquitinés en Lys⁶³ avant leur internalisation et la DUB AMSH, ayant une spécificité d'action sur la Lys⁶³

(Duncan et al., 2006; Geetha et al., 2005; Huang et al., 2006), a été identifiée comme impliquée dans la régulation de l'endocytose (Sato et al., 2008). L'ubiquitination en Lys⁶³ est aussi impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, la protéine PCNA de la famille des clamps glissants de l'ADN peut être mono-ubiquitinée, favorisant la synthèse translésionnelle de l'ADN, alors que sa poly-ubiquitination en Lys⁶³ va à l'inverse limiter les erreurs lors de la réplication (Moldovan et al., 2007). L'histone H2A va également être poly-ubiquitinée en Lys⁶³ par les E3 ligases RNF8 et RNF168 après des dommages à l'ADN (Doil et al., 2009; Mailand et al., 2007).

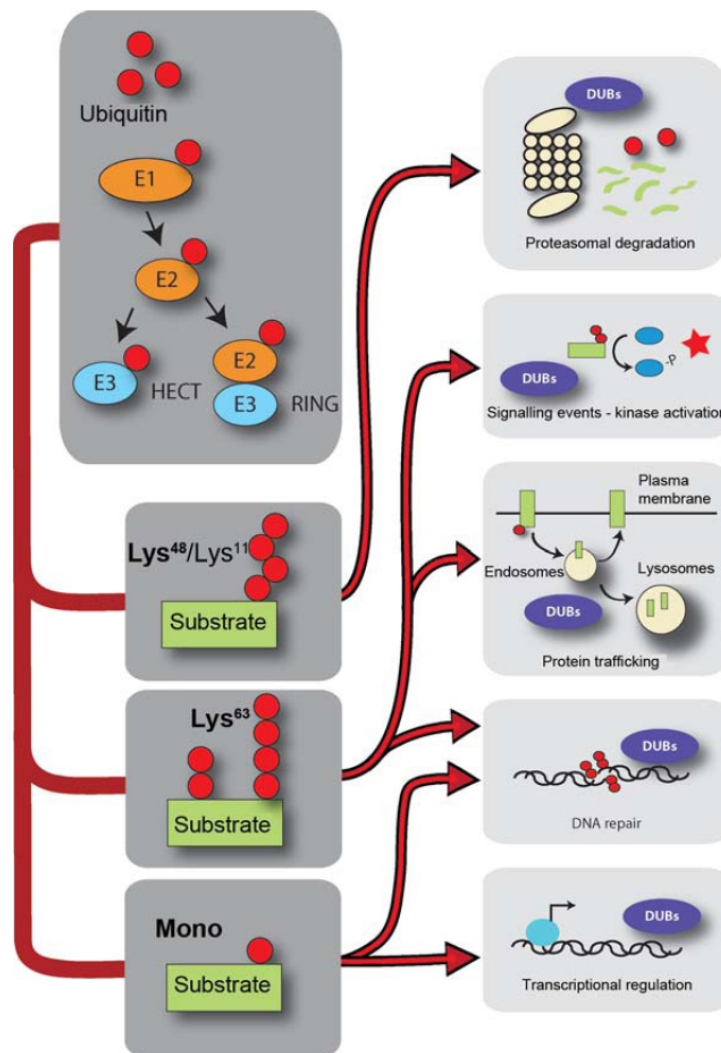


Figure 16 : Ubiquitination : machinerie et fonctions associées. (Tiré de Neutzner and Neutzner, 2012)

- **L'ubiquitination en Lys¹¹** : Bien que moins prépondérante que l'ubiquitination en Lys⁴⁸, l'ubiquitination en Lys¹¹ a également été caractérisée comme impliquée dans la dégradation des protéines (Baboshina and Haas, 1996; Xu et al., 2009). Cette ubiquitination s'est révélée importante dans le cycle cellulaire. L'E3 ligase, APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome), et l'E2 ligase, UBE2C/UbcH10 qui fonctionne avec APC/C, régule le cycle cellulaire en assemblant des chaînes Lys¹¹ sur les protéines qui doivent être dégradé par le protéasome durant le cycle (Jin et al., 2008).
- **L'ubiquitination en Lys⁶** : Le rôle de cette poly-ubiquitination est toujours méconnu. Toutefois un complexe d'E3 ligase RING hétérodimérique a été identifié comme ubiquitinant en Lys⁶. Le complexe est composé des protéines BRCA1 et BARD1 et va ubiquitiner RAP80 en Lys⁶ et Lys⁶³, lors des mécanismes de dommages à l'ADN (Sobhian et al., 2007).
- **L'ubiquitination en Lys²⁷, Lys²⁹ et Lys³³** : Ces trois sites d'ubiquitination étant très proches, peu de données formelles les concernant existent. La protéine U-box-containing Ufd2a est capable d'ubiquitiner en Lys²⁷ et Lys³³, mais il n'y a pas de rôle connu de l'ubiquitination par Lys²⁷ (Hatakeyama et al., 2001). Les E3 ligases HECT polyubiquitinent leurs cibles en Lys²⁹. Parmi celles-ci, les E3 ligases HECT Deltex et Ufd5 sont impliquées dans la dégradation lysosomale et l'UFD (ubiquitin fusion degradation) (Chastagner et al., 2006; Johnson et al., 1995). Enfin, nombres de protéines reliées à la famille AMPK (AMP-activated protein kinase) sont poly-ubiquitinées en Lys²⁹ et/ou en Lys³³. La DUB USP9X régule l'ubiquitination de ces protéines et il apparaît que ces ubiquitinations Lys²⁹/Lys³³ ont pour effet d'inhiber la phosphorylation des protéines de la famille AMPK (Al-Hakim et al., 2008; Jaleel et al., 2006).

Outre les ubiquitinations sur les différentes lysines, différents types de chaînes existent et déterminent des fonctions de l'ubiquitination.

- **La mono-ubiquitination** : Il s'agit de la fixation sur l'une des lysines de la protéine d'une unique ubiquitine et non d'une chaîne de poly-ubiquitination. Une protéine peut être mono-ubiquitinée sur plusieurs sites. La mono-ubiquitination est essentiellement non dégradative et participe à la régulation d'expression des gènes, à la réponse aux dommages à l'ADN et au trafic cellulaire. La monoubiquitination régule la localisation subcellulaire. En effet, plusieurs récepteurs de l'endocytose tel que par exemple l'EGF récepteur ou le PDGF récepteur, sont mono-ubiquitinés de même que leurs protéines cibles pour permettre leur recrutement lors de ce mécanisme (Haglund et al., 2003). Les histones H2A et H2B ont également été décrites comme mono-ubiquitinées et cette ubiquitination varie durant le cycle cellulaire suggérant un rôle dans la division cellulaire, la réparation et la réplication de l'ADN (Weake and Workman, 2008). Toutefois le rôle exact de cette ubiquitination des histones reste incertain.
- **Les chaînes d'ubiquitination linéaire** : La polyubiquitination est l'assemblage de plusieurs ubiquitines via leur résidu glycine C-terminal au groupement ϵ -amine d'un résidu lysine d'une

autre ubiquitine. Toutefois en 2006, Iwai et ses collaborateurs décrivent le complexe E3 ligase LUBAC constitué de deux protéines à domaine RING, HOIL-1 (haem-oxidized iron-regulatory protein 2 ubiquitin ligase-1) et HOIP (HOIL-1-interacting protein). Ce complexe est capable de synthétiser une chaîne de poly-ubiquitine d'un nouveau type, où le résidu glycine C-terminal d'une ubiquitine se lie au groupement α -amine d'un résidu méthionine N-terminal d'une autre ubiquitine. Cette chaîne particulière fut appelée chaîne d'ubiquitine linéaire. Iwai dans son étude a montré l'importance de cette chaîne dans la voie NF- κ B car la protéine NEMO du complexe IKK est capable de reconnaître spécifiquement cette chaîne linéaire (Iwai, 2012).

- **La poly-ubiquitination mixée et branchée :** Généralement les chaînes de polyubiquitination sont homogènes. Mais certaines chaînes peuvent présenter des liaisons variées, présentant sur la même chaîne des Met¹, Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys²⁹ et Lys³³. Ces chaînes mixées sont reconnues dans les mécanismes d'endocytose et de signalisation immunitaire (Boname et al., 2010; Emmerich et al., 2013). De même, ces chaînes peuvent présenter une poly-ubiquitination dite branchée dans laquelle une même ubiquitine va lier plusieurs ubiquitines sur différentes lysines Lys²⁷, Lys²⁹ ou Lys³³, créant un branchement tel les différentes branches d'un arbre. L'ubiquitination branchée semble n'avoir pour seul rôle que de permettre l'accélération de la dégradation au protéasome (Meyer and Rape, 2014).

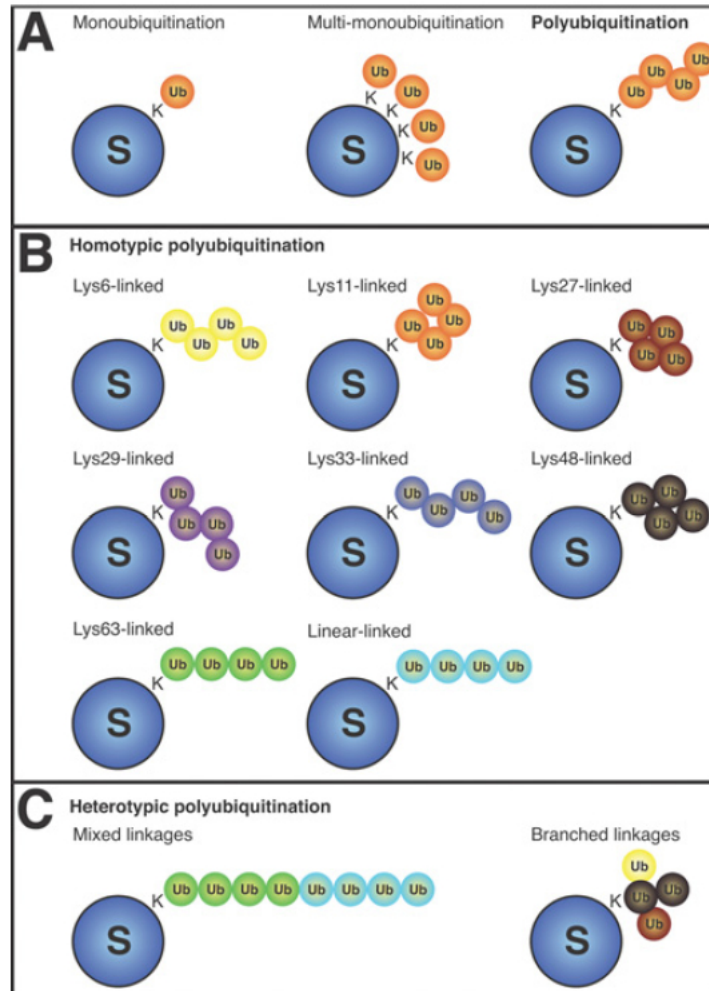


Figure 17 : Les formes d'ubiquitination. (A) Les modifications de l'ubiquitine ont trois dispositions générales : monoubiquitination, multi-monoubiquitination et polyubiquitination. (B) Polyubiquitinations homotypiques, dans lesquelles chaque ubiquitine ne contient qu'un seul type de liaison. De multiples chaînes d'ubiquitine homotypique sur un même substrat sont possibles. (C) Polyubiquitinations hétérotypiques. Dans les chaînes mixées, la chaîne d'ubiquitine alterne les types de liaisons. Dans les chaînes branchées, une seule ubiquitine est prolongée par deux ou plusieurs ubiquitines liées sur les différents résidus lysines de la première ubiquitine. (Tiré de Komander, 2009)

IV.B. Les protéines ubiquitin-like (UBL)

Après la découverte de l'ubiquitine et de ses fonctions, plusieurs protéines aux fonctions similaires ont été découvertes. Ce sont de petites protéines de 8 à 20 kDa, présentant des structures primaires très diverses mais ayant toutes la même structure tridimensionnelle, semblable à celle de l'ubiquitine. Ainsi comme l'ubiquitine, l'attachement de ses protéines peut changer et altérer la fonction de leur substrat (Hochstrasser, 2009; Schulman and Harper, 2009).

Les ubiquitin-like (UBL), comme l'ubiquitine, présentent toutes un domaine globulaire comprenant une hélice α entourée par quatre feuillets β (le « β -grasp fold ») et une queue C-terminale flexible qui se termine par une glycine, indispensable à la conjugaison. Les UBL présentent le même mode de conjugaison que l'ubiquitine et tout comme cette dernière sont d'abord synthétisées sous forme d'un précurseur inactif. Elles seront soumises aux mêmes cascades de réaction que l'ubiquitine, avec les enzymes E1-E2-E3 et les DUBs. A ce jour, 13 UBL ont été identifiées, mais 4 d'entre elles restent putatives (Hochstrasser, 2009; Taherbhoy et al., 2012).

- **NEDD8 (Rub1)** : C'est la plus proche de l'ubiquitine avec 55% d'homologie. Son précurseur est activé par un couple spécifique d'enzyme d'activation E1, NAE1 et UBA3 qui n'ont pas d'action sur l'ubiquitine. NEDD8 n'est prise en charge que par deux enzymes de conjugaison E2, UBE2F ou UBE2M pour un transfert sur une E3 appropriée (Duda et al., 2011). NEDD8 est principalement conjuguée aux cullines entraînant l'activation de ces protéines qui sont des E3 ligases (Cope et al., 2002).
- **SUMO (small ubiquitin-related modifier ; smt3)** : Ces protéines présentent différents isoformes et sont impliquées dans un très grand nombre de fonctions essentielles. Les protéines SUMO n'ont que 17% d'homologie avec l'ubiquitine et présentent 20 résidus supplémentaires en N-terminal. Elles sont activées par un couple spécifique d'enzymes E1, SAE1 et UBA2 et sont transférées sur une unique E2, Ubc9. SUMO va être reconnue par des protéines portant des domaines SIMs (SUMO-interacting motifs) et va ainsi participer à la réparation de l'ADN, le transport nucléaire et les mécanismes de transcription (Creton and Jentsch, 2010; Taherbhoy et al., 2012).
- **ATG12 et ATG8** : Ces UBLs sont activées et requises dans la voie de l'autophagie. Lors de la formation de l'autophagosome, ATG8 et ATG12 vont être activées par une E1 spécifique ATG7, puis ATG12 va être transférée sur ATG5 par l'E2 ATG10 pour constituer un complexe E3 ATG5-ATG12. Ce complexe va avoir pour seule activité de lier ATG8 sur son substrat, le lipide PE (phosphatidylethanolamine). Le PE activé par l'ATG8 va permettre la formation de cargo vésiculaire entre l'autophagosome et les lysosomes (Mizushima et al., 1998; Weidberg et al., 2011).
- **FUBI (MNSF- β , FAU), FAT10, ISG15, Urm1 et UFM1** sont des ubiquitin-like identifiées mais dont la fonction demeure encore assez obscure. ISG15 fut la toute première ubiquitine-like identifiée et Urm1 semble jouer un rôle dans la formation des ARN de transfert (Hochstrasser, 2009).

- **BUBL1/BUBL2, UBL-1, SF3A120 et l'Oligoadenylate synthetase** ne sont, à ce jour, que des UBLs putatives.

IV.C. Les enzymes de l'ubiquitination

La fixation de l'ubiquitine sur un substrat cible nécessite l'action de plusieurs enzymes. La cascade d'enzymes E1-E2-E3 va permettre l'activation de l'ubiquitine et sa fixation sur une cible spécifique.

IV.C.1. Les enzymes d'activation de l'ubiquitine (E1)

Les enzymes d'activation de l'ubiquitine appelées enzymes E1 sont des enzymes à multidomaines qui activent un groupement carboxyle de la glycine 76 en C-terminal de l'ubiquitine à l'aide d'un résidu cystéine de leur site actif. Cette activation est ATP dépendante et correspond à une adénylation du groupement carboxyle C-terminal de l'ubiquitine, formant une liaison thiol-ester entre l'ubiquitine et le résidu cystéine de l'enzyme E1. Ceci permettra aux enzymes E1 de transférer l'ubiquitine activée sur une cystéine du site actif des enzymes E2 grâce à l'interaction de l'E2 avec leur site UFD (ubiquitin fold domain) (Huang et al., 2007; Yang et al., 2007). Le génome humain ne code que pour deux enzymes E1, UBE1 et UBE1L2 (Pelzer et al., 2007).

IV.C.2. Les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2)

Il existe près d'une quarantaine d'enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, appelées enzyme E2. Ce sont des transporteurs de l'ubiquitine qui vont l'amener jusqu' à une E3 ligase. La plupart des E2 sont capables de réaliser la catalyse permettant le transfert de l'ubiquitine à son substrat. Cette catalyse peut se faire également par l'E3 ligase ou la combinaison d'une E2 et d'une E3. Les E2 seules n'ont qu'une faible activité pour cette réaction, seule l'association avec une E3 ligase leur permet d'avoir une activité maximale (Kleiger and Mayor, 2014; Komander, 2009).

IV.C.3. Les enzymes ubiquitine-ligases (E3)

La reconnaissance et le transfert de l'ubiquitine sur son substrat sont réalisés par les enzymes ubiquitine-ligases appelées E3. Il existe plus de 600 enzymes dans cette famille, elles sont les enzymes les plus abondantes des mécanismes d'ubiquitination. Elles ont en charge la spécificité du substrat de l'ubiquitine et agissent comme des plateformes adaptatrices permettant de mettre en contact une enzyme E2 ubiquitinée et une protéine cible pour former une liaison isopeptidique entre le groupement carboxyle C-terminal de l'ubiquitine du site actif de l'E2 et le groupement amine de la chaîne latérale d'un résidu lysine de la protéine cible (Kleiger and Mayor, 2014; Neutzner and Neutzner, 2012). Ces enzymes peuvent être séparées en deux groupes fonctionnels majeurs (Figure 18).

La première famille est celle des E3 comportant un domaine HECT (homologous with E6-associated protein C-terminus). Elles forment une liaison covalente thiol-ester avec l'ubiquitine portée par l'E2, puis la transfèrent au substrat depuis la cystéine de leur site actif.

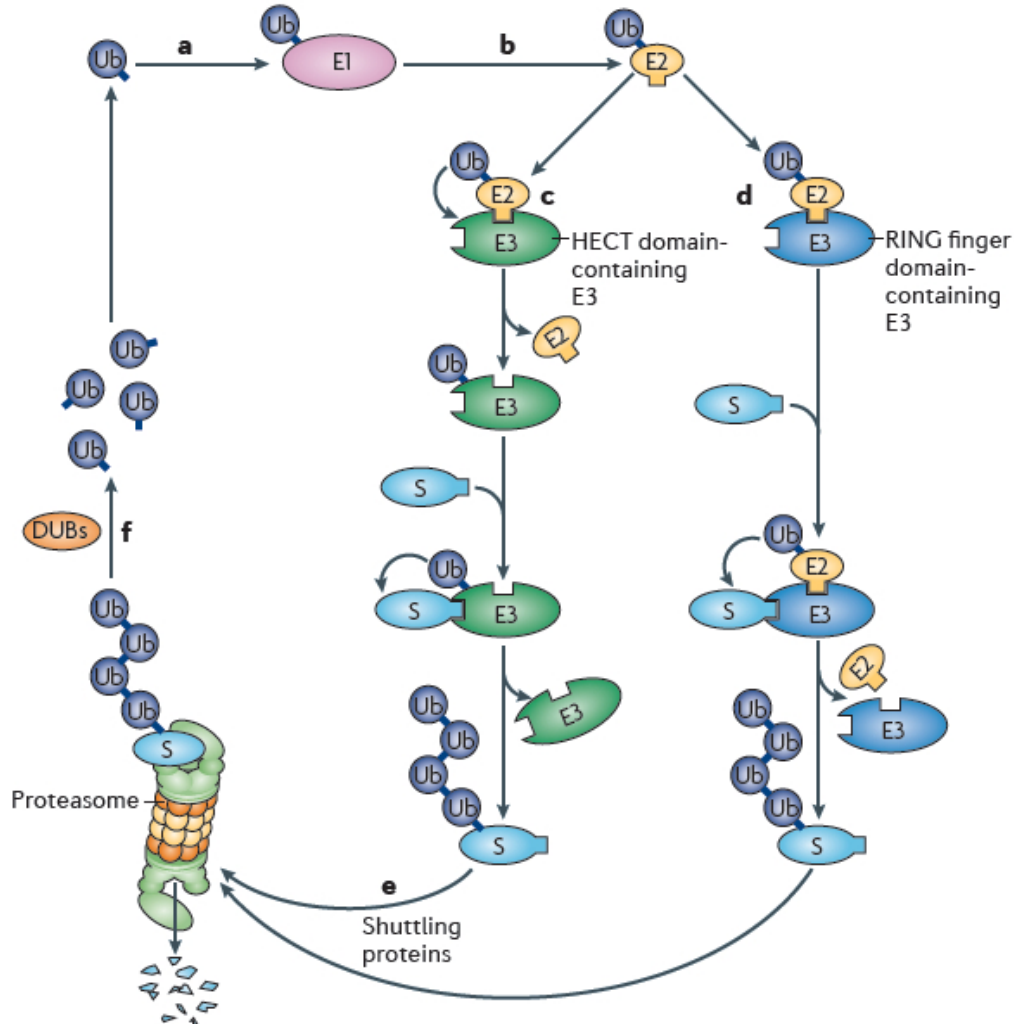


Figure 18 : Le système ubiquitine-protéasome. a) L'ubiquitine est activée par une enzyme E1 à l'aide d'ATP pour former une liaison thiol-ester à haute énergie avec l'enzyme. **b)** L'ubiquitine activée est transférée à une enzyme E2 avec une liaison thiol-ester. **c)** L'ubiquitine peut être transférée sur une E3 ligase à domaine HECT, générant un nouvel intermédiaire à liaison thiol-ester. De là, l'ubiquitine est transférée sur son substrat à l'aide d'une liaison isopeptidique entre la Gly⁷⁷ carboxy-terminal de l'ubiquitine et un groupement ϵNH_2 d'un résidu lysine du substrat. D'autres ubiquitines peuvent être ajoutées pour former une chaîne de polyubiquitine. **d)** Une autre possibilité est que l'enzyme E2 se lie à une E3 ligase à domaine RING. Dans ce complexe, l'E2 transfère directement l'ubiquitine à son substrat. **e)** Dégradation du substrat ubiquitiné en courts peptides par le protéasome 26S. La liaison du substrat ubiquitiné au protéasome peut être directe, ou se faire via des protéines cargos. **f)** L'essentiel des chaînes d'ubiquitine sont retirées du substrat et désassemblées par les DUBs pour être recyclées. (Tiré de Weissman et al., 2011)

La deuxième famille est celle des E3 comportant un domaine RING (really interesting new gene). Ces enzymes agissent comme des plateformes adaptatrices ; elles mettent en contact le substrat avec l'E2 porteuse de l'ubiquitine afin de permettre le transfert sur la cible. Les ligases de cette famille peuvent être monomériques, dimériques ou multimériques.

Il existe d'autres familles d'E3 ligases, mais celles-ci sont largement minoritaires par rapport aux deux premières.

IV.C.4. L'activité E4

Le mécanisme permettant la formation et l'assemblage des chaînes d'ubiquitine est encore largement débattu. Certaines protéines semblent capables de procéder à l'attachement d'une ubiquitine sur une autre ubiquitine. Une telle activité est appelée activité E4 ligase. On parle d'activité E4 et non d'enzymes E4 car, contrairement à la croyance initiale, les protéines capables d'une telle activité se sont révélées être des E3 ligases. Ces E3 sont capables de lier un substrat spécifique ubiquitiné tout en liant une autre E3 afin de travailler en coopération avec elle et permettre la formation d'une chaîne de poly-ubiquitine. Le meilleur exemple d'une telle activité s'est retrouvée chez les E3 ligases Ubr1 de la famille à domaine RING et Ufd4 de la famille HECT. Ces deux enzymes agissent ensemble. Pendant qu'Ubr1 va reconnaître la séquence N-terminale cible, Ufd4 va accomplir la formation de la chaîne de par une activité E4 ligase. Le rôle de ces deux enzymes peut s'inverser avec Ufd4 prenant en charge la cible et Ubr1 démontrant l'activité E4. Le rôle de ses enzymes dépend alors des circonstances (Metzger and Weissman, 2010).

IV.D. Les enzymes de déubiquitination

Les DUBs sont des protéases à cystéine qui clivent l'ubiquitine ou les protéines ubiquitine-like présentes sur un substrat. De par leur rôle sur l'ubiquitination des protéines, les DUBs vont être impliquées dans nombre de fonctions cellulaires telles que la dégradation des protéines par le protéasome ou le lysosome, la régulation du cycle cellulaire, l'expression des gènes, la réparation de l'ADN et l'activation des kinases. Plus spécifiquement, elles vont jouer 4 rôles différents dans la voie de l'ubiquitination (Komander, 2009; Wilkinson, 1997) :

- Les DUBs permettent la maturation de l'ubiquitine très probablement lors de la traduction de celle-ci. La proubiquitine est toujours fusionnée avec une ou deux protéines ribosomales ou en chaînes linéaire de poly-ubiquitine. Les DUBs vont cliver ces fusions et chaînes pour permettre le relargage de mono-ubiquitine mature qui devra ensuite être activée par les enzymes E1.
- Les DUBs permettent le recyclage de l'ubiquitine soit depuis les protéines qui vont être dégradées au niveau du protéasome, soit depuis les petits nucléophiles cellulaires qui auraient accidentellement capturé l'ubiquitine lors des réactions de liaison thiol-ester.
- Les DUBs vont permettre la déubiquitination des protéines ubiquitinées par les E3 ligases. Ce rôle est antagoniste à celui de l'ubiquitination selon un modèle similaire aux phénomènes de phosphorylation et déphosphorylation des protéines.

- Les DUBs sont responsables de la régénération du pool de mono-ubiquitine cellulaire à partir de chaînes poly-ubiquitine linéaires ou branchées.

Pour assurer ces différents rôles, les DUBs vont voir leur activité finement régulée afin d'éviter le clivage non spécifique d'un substrat inapproprié. Elles peuvent ainsi être modifiées de façon covalente par phosphorylation, ubiquitination ou sumoylation, modifiant leur activité, leur localisation cellulaire ou leur demi-vie. De plus elles peuvent présenter différents domaines non catalytiques pour les interactions protéines-protéines ou pour lier l'ubiquitine (Reyes-Turcu et al., 2009).

Les DUBs comptent près d'une centaine d'enzymes et sont réparties chez l'homme en cinq grandes familles dont quatre sont des protéases « papain-like » à cystéine et la dernière contient des métalloprotéases dépendant de domaines en doigt de zinc. Une dernière petite famille est connue, mais leur activité et leur affinité pour l'ubiquitine est faible. Cette famille MCPiPs (monocyte chemotactic protein-induced proteins) de protéase à cystéine regroupe les protéases ubiquitine-like qui ont une spécificité pour SUMO et pour NEDD8 et quelques DUBs ressemblant à des protéases à adénovirus.

IV.D.1. Les protéases à domaine Ubiquitine C-terminal Hydrolase (UCH)

Les protéases à domaine ubiquitine C-terminal hydrolase (UCH) possèdent un cœur catalytique de 230 acides aminés. Celui-ci adopte une conformation et une géométrie pour sa triade de résidus impliqués dans la catalyse très proche des enzymes papain (Johnston et al., 1997). Cette famille comporte 4 membres : BAP1, UCHL1, UCHL3 et UCHL5. Ce sont les premières DUBs caractérisées chez l'homme et, particulièrement UCHL1 et UCHL3, qui sont impliquées dans la maturation de l'ubiquitine à partir de chaînes linéaires de précurseurs de l'ubiquitine (Larsen et al., 1998; Wilkinson et al., 1999). Toutefois ce ne sont pas les seules DUBs impliquées dans ce mécanisme et la délétion du seul gène *UCH* de *S. cerevisiae* n'empêche pas la maturation de l'ubiquitine. De plus, plusieurs études de l'activité DUB d'UCH-L1 l'associent à la maladie de Parkinson. Tout ceci ne constitue pas des preuves absolues mais souligne le rôle des DUBs à domaine UCH dans la maturation de l'ubiquitine (Andersson et al., 2011; Konya et al., 2011). Également, les UCH de la drosophile se sont également montrées capable de cliver des protéines ubiquitinées (Zhang et al., 1993).

IV.D.2. Les protéases à domaine Ubiquitine -Spécifique (USP)

Il s'agit de la plus grande famille parmi les DUBs avec plus de 50 membres décrits (Nijman et al., 2005). Leur domaine catalytique contient deux motifs courts et conservés, appelés les boîtes Cys et Hsi, qui contiennent les résidus critiques pour l'hydrolyse de l'ubiquitine. La structure de six domaines USP est extrêmement conservée malgré une faible similarité de séquence. Le domaine USP est constitué de trois sous-domaines : le doigt, la paume et le pouce. Seule la DUB CYLD, une DUB impliquée dans la voie NF- κ B présente une absence du sous-domaine doigt (Komander et al., 2008). Les structures des domaines USP liés à l'ubiquitine ont révélé que la partie C-terminale de l'ubiquitine se positionne dans l'espace localisée entre le pouce et la paume, alors que la structure en β -grasp de l'ubiquitine interagit

avec le doigt (Komander, 2010). Nombre d'USP contiennent d'autres domaines d'interactions protéiques au sein de leur site catalytique.

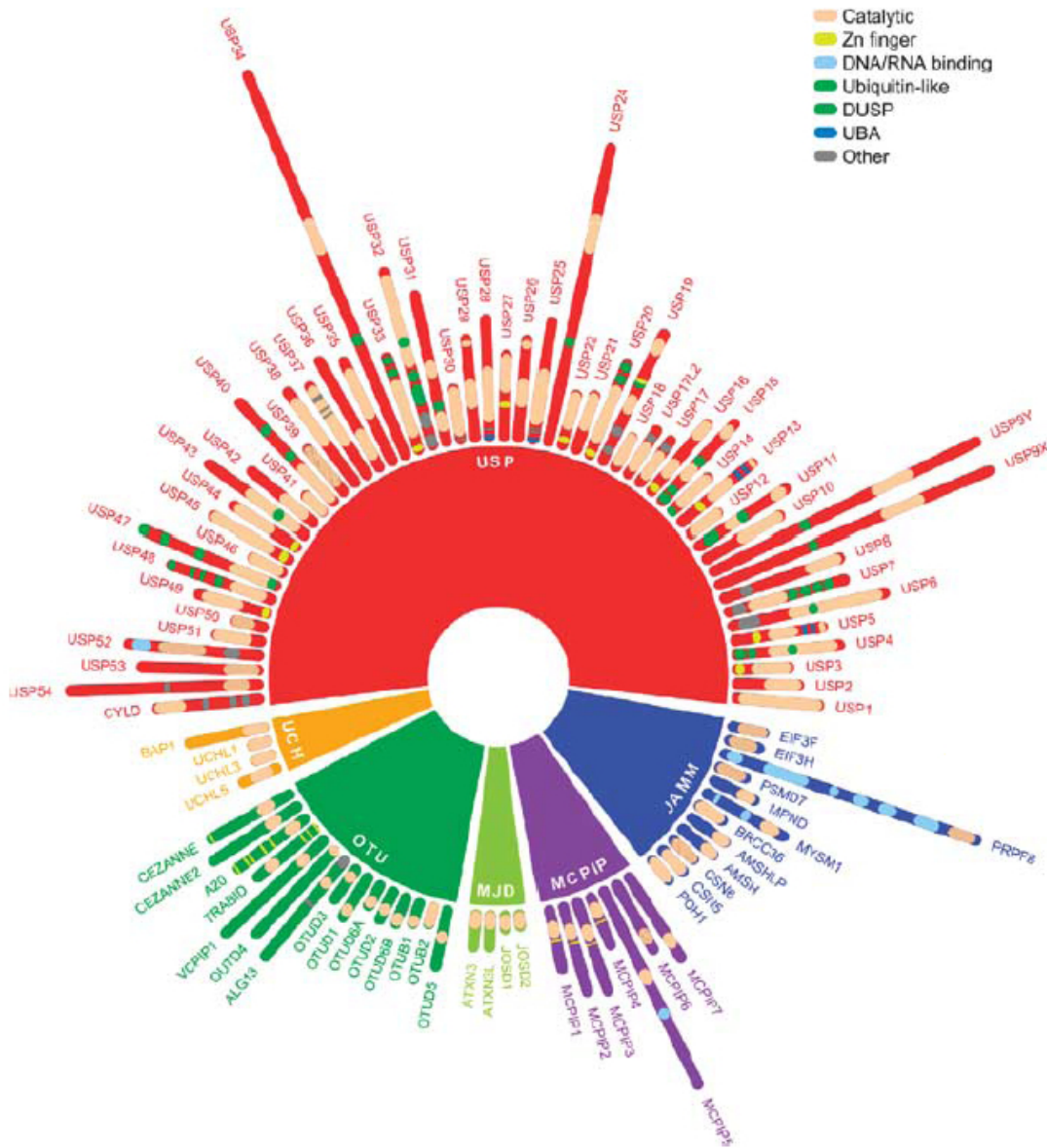


Figure 19 : Classification des DUBs chez l'homme. La longueur de chaque DUB correspond à la taille des protéines en acides aminés. USPs : ubiquitin-specific proteases ; UCHs : ubiquitin carboxy-terminal hydrolases ; OTUs : ovarian-tumor proteases ; MJDs : Machado–Joseph disease protein domain proteases ; JAMMs : JAMM/MPN domain-associated metalloproteases; MCPIPs : monocyte chemotactic protein-induced proteins. (Tiré de Fraile et al., 2012)

IV.D.3. Les protéases à domaine Ovarian Tumor (OTU)

Les protéases à domaine Ovarian Tumor sont impliquées dans le développement de l'ovaire et régulent la localisation et la traduction de certains ARNs. Chez l'homme, quatorze DUBs à domaine OTU ont été mises en évidence, mais toutes ne comportent pas d'activité DUB (Komander et al., 2009). Contrairement aux autres DUBs à cystéine, leur site catalytique ne possède pas de résidu aspartate, la stabilisation de la réaction étant assurée par un réseau de liaisons hydrogènes. Le domaine OTU est composé de cinq feuillets beta, empaquetés entre plusieurs domaines hélicoïdaux qui varient en taille entre les différents membres de la famille (Messick et al., 2008).

IV.D.4. Les protéases à domaine Machado-Joseph Disease (MJD)

Chez l'homme, quatre DUBs à domaine Machado-Joseph Disease (MJD) ont été identifiées. La plus importante est Ataxin-3, les trois autres étant des Ataxin-3-like. Ataxin-3 est la plus étudiée car elle est impliquée dans une maladie neurodégénérative, l'ataxie spinocérébelleuse de type 3. La forme sauvage d'Ataxin-3 est capable de déubiquitiner un substrat *in vivo*, alors qu'un mutant pour la cystéine de cette protéine n'est plus capable de montrer cette activité. Ataxin-3 déconjugue spécifiquement les substrats portant des chaînes de poly-ubiquitine Lys⁶³ (Winborn et al., 2008). La similarité de séquence entre les domaines catalytiques de cette famille catalytique est faible, mais il y a une conservation dans l'arrangement du site catalytique des Ataxin-3-like. La structure du domaine MJD est similaire à celle du domaine UCH (Mao et al., 2005).

IV.D.5. Les protéases à domaine JAMM/MPN+

Cette famille est composée de métalloprotéases à domaine JAMM/MPN+. Ce domaine est retrouvé dans trois groupes du vivant : les bactéries, les archées et les eucaryotes. Mais celui des bactéries ne présente pas d'activité protéase, suggérant que cette fonction a été acquise au cours de l'évolution. Chez l'homme, quatorze protéine à domaine JAMM ont été identifiées (Nijman et al., 2005). Trois membres de cette famille seulement ont été décrits comme comportant une activité DUB : AMSH, POH1 et CSN5. AMSH et POH1 sont capables de déconjuguer l'ubiquitine avec une spécificité pour les chaînes de Lys⁶³ chez AMSH (Sato et al., 2008; Verma et al., 2002). CSN5, elle, montre une spécificité pour l'ubiquitin-like NEDD8 et ses substrats majoritaires sont les cullines (Cope et al., 2002).

IV.E. Le protéasome

La machinerie dédiée à la dégradation des protéines ubiquitinées est le protéasome 26S. Il a été purifié et caractérisé en 1980. C'est un large et dynamique complexe de protéines dont la structure et la séquence sont hautement conservées chez les eucaryotes. Le protéasome utilise l'énergie de l'ATP pour déplier les protéines et les transloquer dans une chambre protéolytique. Il est composé de plus de 30 sous-unités protéiques pour un poids total de 2 000 kDa. Il est tubulaire, constitué d'une chambre catalytique, le protéasome 20S et de deux complexes régulateurs, les protéasomes 19S (Figure 20).

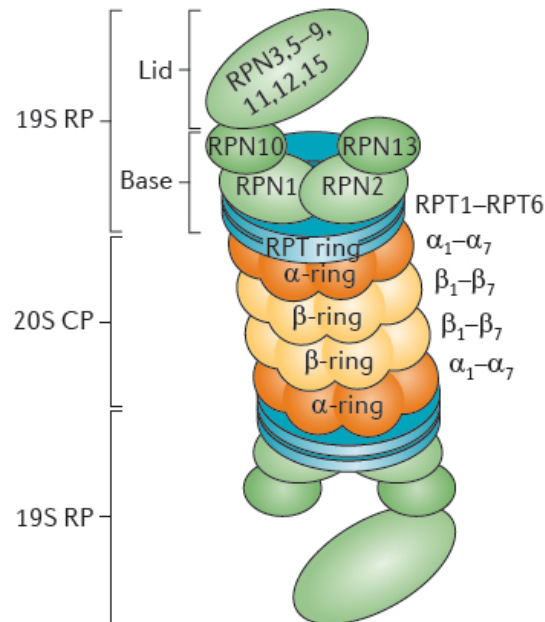


Figure 20 : Structure du protéasome 26S. (Tiré de Weissman et al., 2011)

IV.E.1 Le protéasome 20S

Cette structure est le cœur catalytique du protéasome, située au centre de celui-ci. C'est un complexe multimérique de 700 kDa de forme cylindrique, de 15 nm de long et 11 nm de diamètre. Il est formé d'un empilement axial de quatre anneaux heptamériques : deux anneaux internes β , chacun formé de sept différentes sous-unités β (β_1 - β_7) et de deux anneaux externes α , chacun formé de sept sous-unités différentes α (α_1 - α_7). L'assemblage de ces quatre anneaux forme trois chambres continues avec dans la chambre centrale le site d'activité protéolytique. L'activité protéolytique du protéasome 20S se situe au niveau des extrémités N-terminale des sous-unités β_1 , β_2 et β_5 de chacun des anneaux β . β_1 possède une activité caspase qui clive après les résidus acides ; β_2 possède une activité trypsine qui coupe après les résidus basiques et se situe en environnement acide pour loger les résidus basiques et β_5 possède une activité chymotrypsine qui coupe après les résidus hydrophobes. La protéine dégradée en petits peptides ou en acides aminés va être relarguée par le complexe 19S opposé à son entrée dans le protéasome (D'Arcy and Linder, 2012; Kim et al., 2011).

Les canaux étroits formés par les anneaux α ne va permettre que le passage des protéines dépliées. La partie N-terminale des sous-unités α forme une porte qui peut être ouverte ou fermée pour limiter l'entrée de substrat dans les chambres intérieures. Les complexes régulateurs de l'activité du protéasome se fixent sur ces extrémités N-terminales des sous-unités α . Sans le protéasome 19S, cette porte est fermée dans des conditions physiologiques normales (Groll et al., 2000; Kim et al., 2011).

L'action du protéasome 19S sur cette porte va permettre la régulation des protéines qui vont être dégradées par le protéasome.

Chez les vertébrés, il existe une autre forme de protéasome, l'immunoprotéasome dont la structure est identique au protéasome à l'exception des sous unités β_1 , β_2 et β_5 qui sont remplacées par trois sous-unités β induites par l'IFN- γ , β_{1i} , β_{2i} et β_{5i} . L'immunoprotéasome est responsable de la destruction des protéines étrangères à l'individu en court peptides antigéniques qui seront reconnus par les CMH de classe I (Rock and Goldberg, 1999).

IV.E.2 Le protéasome 19S

Le protéasome 19S fait 700 kDa et peut être subdivisé en deux sous-complexes : la base et le couvercle. La base sert à la fixation au protéasome 20S et sert à la dégradation des peptides ou des protéines non-ubiquitinées ; le couvercle sert à la dégradation des protéines ubiquitinées.

La base est composée de six sous-unités AAA+ ATP dépendantes, Rpt1-Rpt6, et de deux sous-unités ATP indépendantes Rpn1 et Rpn2. Les sous-unités ATP dépendantes forment un anneau hexamérique qui va contrôler l'ouverture de la porte du protéasome 20S. Les Rpn10/S5a et Rpn13/Adrm1 font également partie de la base, mais elles constituent plus les protéines de liaisons entre la base et le couvercle. Le couvercle contient 9 protéines non ATPasiques, Rpn3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 15. Il est fixé sur la base.

Le complexe 19S va servir à la reconnaissance et à la fixation des protéines qui vont être dégradées et permettre la translocation de ces dernières dans le cœur catalytique du protéasome 20S. La reconnaissance et la fixation des substrats poly-ubiquitinés est réalisé par les sous-unités Rpn11 ou Rpn13. Le clivage de la chaîne de poly-ubiquitine se fait grâce à la sous-unité Rpn11 du couvercle qui a une activité isopeptidase et permet le recyclage de l'ubiquitine. La protéine déubiquitinée est alors linéarisée au niveau de la base grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP puis transloquée dans le canal du protéasome 20S (D'Arcy and Linder, 2012; Kim et al., 2011).

IV.E.3 Les enzymes de déubiquitination liées au protéasome

L'ubiquitine n'est généralement pas dégradée par le protéasome. Lorsqu'une protéine ubiquitinée va être dégradée, des enzymes de déubiquitination vont cliver cette chaîne d'ubiquitine pour qu'elle soit recyclée et non pas dégradée par le cœur protéolytique 20S. Ainsi, on dénombre trois DUBs associées au protéasome 19S (Figure 21). Deux d'entre-elles sont des protéases à cystéines UCHL5/UCH37 de la famille UCH et USP14/UBP6 de la famille USP. La dernière, Rpn11/POH1 est une protéase Zn^{2+} -dépendante de la famille JAMM (D'Arcy and Linder, 2012).

L'action exacte de ses DUBs reste peu claire, mais il semblerait que le rôle de Rpn11/POH1 soit simplement d'amputer la protéine de toute sa chaîne de poly-ubiquitine avant sa dégradation (Verma et al., 2002). A l'inverse, il semblerait qu'UCHL5 et USP14 clivent la chaîne un peu plus en amont de l'extrémité distale liée à la protéine. Ce processus a un effet antagoniste à la dégradation et va

permettre une libération de la protéine sans que celle-ci soit dégradée. Ces deux enzymes exerceraient ainsi une fonction de contrôle qualité sur les substrats à dégrader en formant des chaînes courtes d'ubiquitine sur les protéines (Lam et al., 1997). En effet, une protéine présentant une chaîne inférieure à quatre ubiquitines ne sera pas reconnue par le protéasome pour la dégradation.

USP14 et UCHL5 vont réguler dynamiquement la destruction des protéines par le protéasome. UCHL5 a, de plus, été décrite comme ayant une activité substrat spécifique avec une préférence notamment pour NOS (Nitric Oxide Synthase) ou I κ B (Mazumdar et al., 2010). Pour affiner cette régulation, l'activité d'UCHL5 est elle-même régulée par son association avec le récepteur à l'ubiquitine Rpn13/ADRM1 qui va l'activer, alors que son association avec le complexe INO80 va inhiber son activité déubiquitinase (Yao et al., 2008).

USP14 se voit de même complètement activée, lorsqu'elle est liée au protéasome. Son action sur la régulation au protéasome ne dépend pas que de son activité DUB. Sa simple présence au protéasome contribue à réguler l'ouverture de la porte du protéasome 20S (Hanna et al., 2006; Peth et al., 2009). Les études de Hanna et al. ou Peth et al. suggèrent ainsi qu'USP14 a plutôt une action inhibitrice de la dégradation par le protéasome.

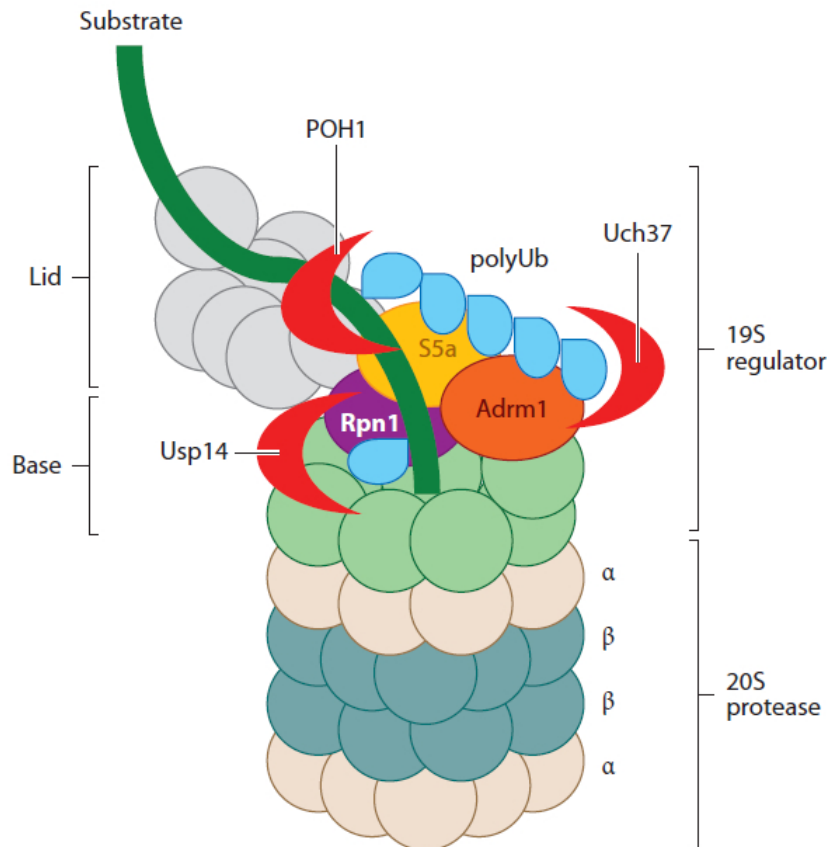


Figure 21 : Les enzymes de déubiquitination du protéasome. Le protéasome lie plusieurs DUBs. Celles-ci sont identifiées en rouge, le substrat par une ligne verte et l'ubiquitine en bleu. (Tiré de Reyes-Turcu et al., 2009)

V. Le protéasome et les enzymes de déubiquitination dans les cancers

V.A. Le protéasome comme cible thérapeutique dans les cancers

Le protéasome 26S se trouve à la terminaison de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, de nombreuses drogues interférant avec les fonctions du protéasome montrent un effet dans la survie cellulaire. Plusieurs protéines dégradées par le protéasome sont impliquées dans les voies de survie, perturber l'action du protéasome sur ces voies va induire des mécanismes de mort cellulaire.

Inhiber le cœur protéolytique 20S du protéasome va ainsi contribuer à stabiliser le suppresseur de tumeur p53 (Williams and McConkey, 2003) et les kinases dépendantes des cyclines p21 et p27 (Hideshima et al., 2001) entraînant un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose p53 dépendante. Cette inhibition va également favoriser les niveaux d'expression de protéines anti-apoptotiques tel que BID, BAX et BIK/NBK (Nikrad et al., 2005; Zhu et al., 2005) et activer la kinase pro-apoptotique JNK (c-jun N-terminal kinase) (Yang et al., 2004) augmentant les signaux apoptotiques. Cette inhibition du protéasome induit en parallèle un stress du réticulum endoplasmique (RE). En effet, les protéines mal conformées à la sortie du RE vont être dégradées par le protéasome. Son inhibition va donner lieu à une augmentation de ces protéines présentant de mauvaises conformations dans le réticulum endoplasmique, déclenchant une réponse des protéines heat-shock et une activation de la caspase-4 aboutissant à une apoptose de la cellule (Nawrocki et al., 2005). Les leucémies ont une grande activité du protéasome et sont particulièrement sensibles à la dérégulation de son activité (Caravita et al., 2006). Ceci pourrait venir du fait que ces pathologies ont un haut niveau de production de protéines et pourrait donc accentuer l'effet de stress au RE.

A ce jour, six inhibiteurs du protéasome sont en test clinique (Crawford and Irvine, 2013; D'Arcy and Linder, 2012) sur des pathologies hématopoïétiques.

- **Le bortezomib (PS-341, NSC 681239, Velcade®)** : C'est un dipeptide synthétique d'acide boronique, inhibant réversiblement l'activité chymotrypsine du protéasome 20S. C'est le premier inhibiteur du protéasome à avoir été utilisé en essai clinique. Il a été approuvé pour le traitement du myélome multiple et les lymphomes du manteau. Le bortezomib et ses dérivées sont à l'essai pour de nombreuses autres pathologies. Une surexpression de protéines anti-apoptotiques, notamment BCL-2, BCL-X_L et MCL-1, sont capables d'inhiber les effets du bortezomib (Hagenbuchner et al., 2010; Podar et al., 2008; Smith et al., 2011).
- **Carfilzomib (PR-171)** : C'est un epoxyketone analogue de l'epoxomicine, un inhibiteur naturel du protéasome. Il se lie de manière irréversible aux groupes hydroxyles et amines des résidus thréonine catalytiques du protéasome 20S, inhibant l'activité chymotrypsine de celui-ci. Il a été approuvé comme traitement de troisième intention pour des patients atteints de lymphomes des cellules plasmiques et ayant rechuté après traitement au bortezomib et aux IMiDs.
- **Ixazomib (MLN9708)** : C'est un peptide synthétique d'acide boronique comme le bortezomib. Il inhibe également réversiblement l'activité chymotrypsine du protéasome 20S mais sa demi-vie est un peu plus courte que le bortezomib. C'est le premier inhibiteur du protéasome

administrable par voie orale. Il est à l'étude sur des patients atteints de lymphomes des cellules plasmatisques.

- **Marizomib (NPI-0052)** : C'est un β -lactone dérivé de la bactérie marine *Salinospora tropica*. Il lie de manière irréversible les trois sites catalytiques du protéasome 20S. Administrable par voie orale, il montre des résultats prometteurs sur des patients réfractaires ou en rechutes atteints de myélomes ou de lymphomes.
- **Delanzomib (CEP-18770)** : C'est un peptide synthétique d'acide boronique comme le bortezomib. Il inhibe également réversiblement l'activité chymotrypsine du protéasome 20S. Il est à l'étude sur des patients atteints de lymphomes des cellules plasmatisques.
- **Oprozomib (ONX0912, PR-047)** : C'est un analogue du carfilzomib administrable par voie orale. Il est à l'étude sur des patients atteints de lymphomes des cellules plasmatisques.

V.B. Les enzymes de déubiquitination comme cibles thérapeutiques dans les cancers

De par leurs fonctions, les DUBs sont impliquées dans presque toutes les grandes voies de signalisation et fonctions de la cellule. Leur rôle est donc particulièrement important pour cette dernière et l'altération des DUBs dans leur expression ou leur activité va promouvoir les mécanismes cancéreux et les voies qui y sont associées (Komander et al., 2009; Pal et al., 2014; Reyes-Turcu et al., 2009).

V.B.1 Les enzymes de déubiquitination mutées dans les cancers

A l'exception notable de CYLD qui est couramment retrouvée mutée dans les cylindromatoses familiales conduisant à des cancers de la peau, les mutations récurrentes des DUBs sont très rares dans les cancers.

La seule translocation chromosomale connue impliquant une USP est la fusion du promoteur CDH11 à la forme longue d'USP6 conduisant à une augmentation des transcrits de cette DUB (Oliveira et al., 2006). Dans les leucémies myéloïdes chroniques et les leucémies myéloïdes aiguës, il est possible de retrouver des fusions des gènes des DUBs USP42 et USP16 avec le gène RUNX (Gelsi-Boyer et al., 2008; Masetti et al., 2014).

Dans diverses hémopathies malignes, des mutations génétiques peuvent conduire à la surexpression des niveaux d'ARN messagers de plusieurs DUBs. Ainsi USP33/VDU1 est surexprimée dans les leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules B (De Pitta et al., 2005), USP50 est surexprimée dans les leucémies myéloïdes aiguës (Figueroa et al., 2010) et USP9X, UCH-L5 et USP14 sont surexprimées dans les myélomes multiples (Schwickart et al., 2010; Tian et al., 2014).

V.B.2 Les enzymes de déubiquitination dans la régulation du cycle cellulaire

Plusieurs DUBs sont des composants de la machinerie du cycle cellulaire ou des checkpoints de ce cycle. Ainsi CYLD, USP13, USP37, USP39 et USP44 sont des régulateurs essentiels de la mitose. CYLD est requise pour déterminer le moment de l'entrée en mitose à travers la régulation de la polo-like kinase 1 (Stegmeier et al., 2007b). USP13, recrutée par Ufd1, va avoir un rôle antagoniste du complexe anaphase-promoting complex-Cdh1 (APC/C-Cdh1) dans l'ubiquitination de Skp2. Par son action, USP13 va permettre l'accumulation de l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p27 et entraîner un allongement du temps du cycle cellulaire (Chen et al., 2011). Il en est de même pour USP37, qui activée par CDK2, va s'opposer à l'ubiquitination de la Cycline A par APC/C-Cdh1 et promouvoir l'entrée en phase S (Huang et al., 2011). USP39, quant à elle, régule les niveaux de la kinase Aurora B dans le checkpoint de l'intégrité du fuseau mitotique (van Leuken et al., 2008). USP44 va réguler l'activation d'APC/C en stabilisant son inhibiteur, le complexe Mad2-Cdc20, et participe ainsi au contrôle de l'initiation de l'Anaphase (Stegmeier et al., 2007a).

D'autres DUBs interfèrent plus indirectement dans le cycle cellulaire. USP50 stabilise HSP90 qui va inhiber l'entrée en mitose (Aressy et al., 2010). USP17L2 stabilise Cdc25A et contribue à la transformation oncogénique (Pereg et al., 2010) et USP2 stabilise la Cycline D1 entraînant une forte prolifération cellulaire (Shan et al., 2009).

Par leur régulation des différents acteurs du cycle cellulaire, les DUBs peuvent être impliquées dans de nombreux mécanismes cancéreux. En effet, il s'est avéré que la diminution ou l'absence de p27, protéine indirectement régulée par USP13 et APC/C, sont impliquées dans plusieurs lymphomes malins dont le lymphome du manteau et les DLBCL (Chiarle et al., 2000; Geisen et al., 2003; Seki et al., 2010). La surexpression de la Cycline D1, stabilisée par USP2, est retrouvée dans les lymphomes du manteau et d'autres LNH (Hachem and Gartenhaus, 2005). Enfin, HSP90, stabilisée par USP50, est surexprimée dans les lymphomes B et T (Robles et al., 2006; Shringarpure et al., 2006).

V.B.3 Les enzymes de déubiquitination dans la régulation de la chromatine et des dommages à l'ADN

La régulation des dommages à l'ADN est un mécanisme fréquemment perturbé dans les processus oncogéniques. USP1 déubiquitine et stabilise la protéine de l'anémie de Fanconi, FANCD2, et promeut les mécanismes de réparation des cassures doubles-brins de l'ADN (Guervilly et al., 2011). BRCC36, USP3, USP16 et OTUB1 contrôlent la voie RNF8/168 de réparation de cassure à l'ADN (Al-Hakim et al., 2010). USP11 est impliquée dans la voie BRCA2 de réponse aux dommages induit par la mitomycine C (Schoenfeld et al., 2004) ainsi qu'USP28 dans la voie CHK2-p53-PUMA (Zhang et al., 2006). USP47 a été identifiée comme jouant un rôle dans la déubiquitination de Pol β (the base excision repair DNA polymerase), enzyme cruciale dans la réparation de l'ADN et la maintenance de son intégrité (Parsons et al., 2011). Enfin, USP24 stabilise DDB2/p48 qui est impliquée dans les mécanismes de reconnaissance et de réparation de l'ADN dans la voie NER après un stress aux UV (Zhang et al., 2012).

Sept DUBs ont été identifiées comme capables de déubiquitiner des histones. USP3, USP7, USP16, USP21, USP22, MYSM1 et BRCC36 sont toutes capables de déubiquitiner les histones H2A et H2B

(Atanassov et al., 2011). Parmi celles-ci, USP7 et USP11 déubiquitinent MEL18 et BMI qui affectent la régulation transcriptionnelle de p16^{INK4A} (Maertens et al., 2010), protéine souvent mutée dans les cancers hématopoïétiques (Hackanson et al., 2005).

V.B.4 Les enzymes de déubiquitination dans les voies de signalisation

Les DUBs interviennent dans de nombreuses voies de signalisation. Nombre de ces voies sont fréquemment altérées dans les processus cancéreux. De par leur fonction et leur rôle dans ces voies, les DUBs constituent de nouvelles cibles de choix pour l'élaboration de traitement anticancéreux.

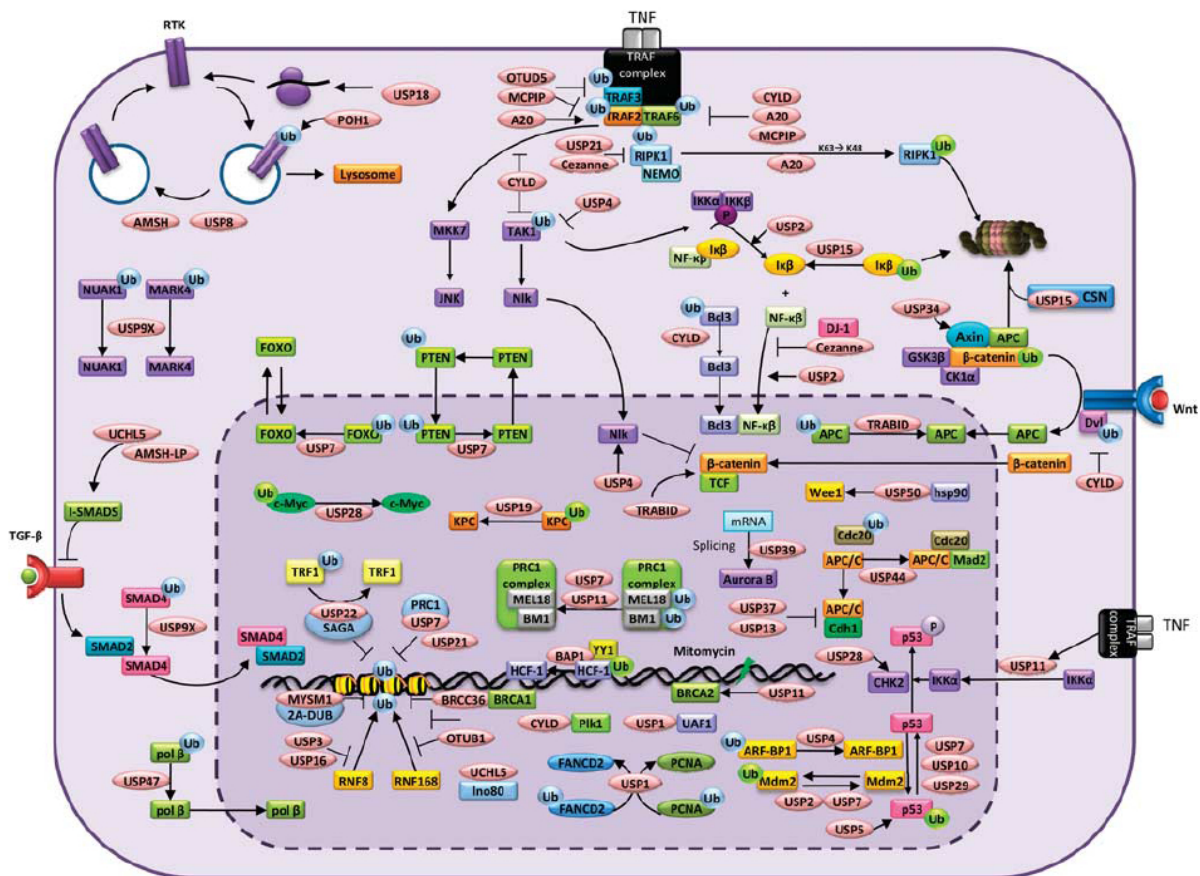


Figure 22 : Panorama des différents rôles des DUBs dans les cancers. Les DUBs impliquées dans les voies de signalisation sont en roses. Les ubiquitines en vert correspondent aux ubiquitinations en Lys⁴⁸ qui vont mener les protéines au protéasome, alors que celles en bleu représentent les chaînes non liées à la lys⁴⁸. (Tiré de Fraile et al., 2012)

a) La signalisation p53

p53, suppresseur de tumeur impliqué dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, est muté dans plusieurs types de tumeur (Harris and Levine, 2005). Plusieurs DUBs ont été décrites comme participant à la régulation de cette protéine.

p53 est régulée par une E3 ligase, MDM2. Or il s'est avéré que l'une des DUBs de p53, USP7, déubiquitine également MDM2. De par son action sur ces deux acteurs, USP7 contribue à la stabilité des deux protéines. Ainsi selon que son action soit prédominante sur MDM2 ou sur p53, USP7 aura une action oncogénique ou suppresseur de tumeur (Kon et al., 2010). USP2a a également été identifiée comme une DUB de MDM2 et MDM4, impactant indirectement la régulation de p53 (Stevenson et al., 2007; Wang et al., 2014b). USP10 est une autre DUB de p53 qui a la particularité de stabiliser aussi bien le p53 sauvage que ses formes mutées présentes dans certains cancers. Cette DUB aura donc un impact différent sur la cellule selon le statut mutationnel de p53 (Yuan et al., 2010). USP5 contribue à réguler la localisation de p53, son extinction entraînant une augmentation de p53 au noyau et favorise sa transcription (Dayal et al., 2009). USP29 stabilise p53 dans la réponse au stress oxydatif (Liu et al., 2011). Plus indirectement, USP4 stabilise ARF-BP1 /HUWE1/MULE qui va promouvoir la dégradation de p53 (Zhang et al., 2011a). Très récemment, USP15 a été identifiée comme une DUB de MDM2. Son action a pour effet de stabiliser p53 mais aussi NFATc (Zou et al., 2014). Enfin, récemment, Otub1 a été démontrée comme stabilisant p53, ceci sans faire intervenir son action de déubiquitination. Sa liaison à p53 va empêcher la fixation de MDM2 et donc l'ubiquitination et la destruction de p53 (Sun and Dai, 2014).

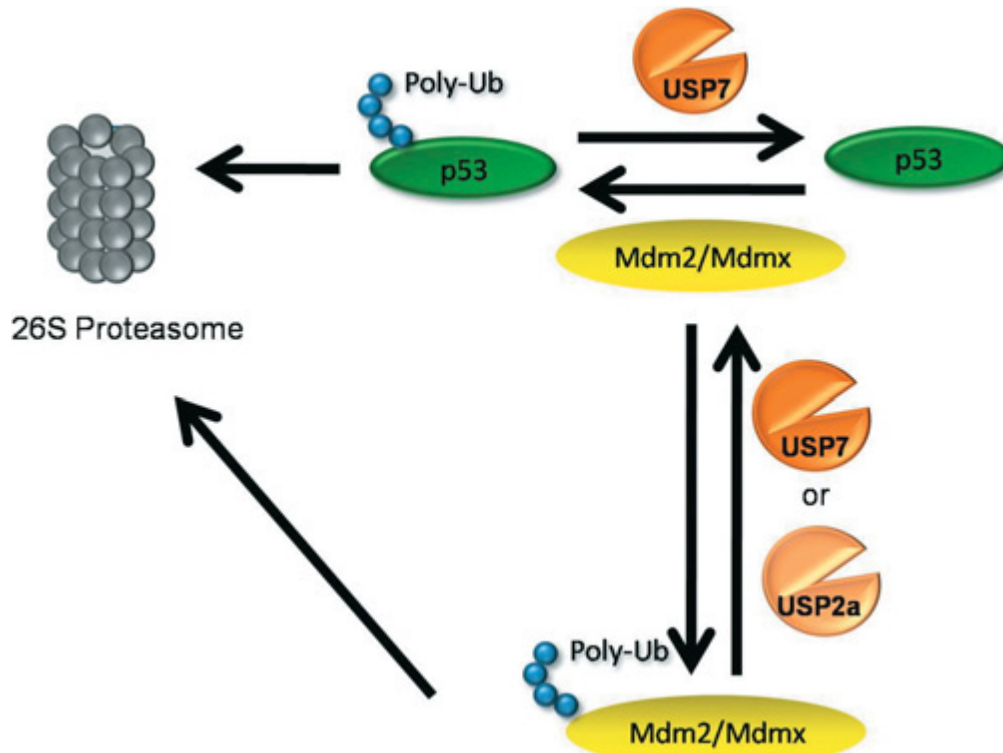


Figure 23 : La régulation de p53 par le système ubiquitine-protéasome. La régulation de p53 illustre le système complexe d'interactions en DUBs et E3 ligases. (Tiré de Ventii and Wilkinson, 2008)

b) La signalisation NF- κ B

NF- κ B est un important modulateur de la réponse immunitaire souvent activé constitutivement dans les cancers. La dérégulation de cette voie, essentiellement par son activation, est associée à de nombreux lymphomes malins. A l'inverse, bloquer la dégradation de la protéine I κ B, inhibitrice de la voie NF- κ B, par le protéasome, aboutit à la disparition des signaux de survie et à une action pro-apoptotique dans la cellule (Davis et al., 2001; Stoffel, 2005).

De nombreuses DUBs interviennent dans la régulation de cette voie de signalisation. A20 et CYLD déubiquitinent toutes deux TRAF6 (Harhaj and Dixit, 2011). CYLD, en plus de son action dans le cycle cellulaire, déubiquitine également TGF- β -activated kinase 1, BCL-3 et les MAPK. A20 contribue à la dégradation de TRAF2 par les lysosomes en régulant l'activité de son E3 ligases et à la dégradation de RIPK1 par le protéasome. USP21 inhibe la voie NF- κ B en régulant l'ubiquitination de RIPK1 (Xu et al., 2010). Cezanne, une DUB à domaine OTU interagit avec DJ-1, régulant ainsi indirectement l'ubiquitination de RIPK1 et l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (McNally et al., 2011). OTUD5 déubiquitine TRAF3, diminuant les réponses aux interférons de type I et à l'interleukine-10 (Gonzalez-Navajas et al., 2010). MCP1P1 est capable de déubiquitiner TRAF2, 3 et 6, inhibant ainsi la kinase JNK (Liang et al., 2010). USP31 est capable d'interagir avec TRAF2 pour conduire à l'activation de NF- κ B (Tzimas et al., 2006).

USP15 (Schweitzer et al., 2007) et USP11 stabilisent I κ B α sous induction au TNF α (Yamaguchi et al., 2007). USP2 déjà impliquée dans le cycle cellulaire, est également nécessaire au processus de phosphorylation d'I κ B dans l'induction au TNF α (Metzig et al., 2011). USP14 déubiquitine I- κ B ce qui a pour effet de conduire à sa dégradation (Mialki et al., 2013). Enfin, USP4, impliquée dans la régulation de la voie p53 intervient également sur la voie NF- κ B en déubiquitinant TGF- β -activated kinase 1 dans l'induction au TNF α (Fan et al., 2011), mais également TRAF2, TRAF6, TAK1 et RIPK1 (Hou et al., 2013).

C) La signalisation Wnt

La signalisation Wnt, régulatrice de la différenciation cellulaire, est une voie très impliquée dans de nombreux cancers. La régulation de cette voie est possible à de multiples niveaux. Ainsi, CYLD et USP4, toutes deux déjà impliquées dans d'autres voies (cycle cellulaire, régulation de p53 et NF- κ B), sont capables d'inhiber la voie Wnt. USP4 interagit avec Nemo (Zhao et al., 2009) et CYLD déubiquitine Dishevelled (Tauriello et al., 2010). USP14, DUB liée au protéasome est également capable de déubiquitiner Dishevelled (Jung et al., 2013). USP15 et USP34 régulent positivement la voie Wnt en inhibant l'action de la β -caténine. USP15 augmente sa dégradation en stabilisant APC (adenomatous polyposis coli) et USP34 empêche la transcription β -caténine dépendante (Huang et al., 2009; Lui et al., 2011). Enfin TRABID est impliquée dans la régulation de la transcription des gènes de la voie *Wnt*, mais aussi dans la déubiquitination d'APC (Tran et al., 2008).

d) La signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases

Les récepteurs aux tyrosines kinases sont des acteurs importants dans la transmission de signaux de survie cellulaire et sont responsables de nombreuses anomalies dans de nombreux cancers (Mosesson et al., 2008). Quelques DUBs sont connues pour réguler ces récepteurs. USP18 a été identifiée comme un régulateur de la traduction de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) en stabilisant l'expression de miR-7 (Duex et al., 2011). POH1 est un régulateur de l'ubiquitination d'ErbB2 mais n'est pas impliquée dans sa dégradation (Liu et al., 2009). AMSH déubiquitine l'EGFR et ErbB2 permettant leur sortie du lysosome et leur recyclage (Meijer et al., 2012). USP2a a été identifiée comme un régulateur de l'endocytose de l'EGFR (Liu et al., 2013b). Enfin, USP8 est impliqué dans la régulation des récepteurs aux tyrosines kinases. Toutefois son rôle est encore discuté car selon les études, elle permet leur recyclage à la membrane (Niendorf et al., 2007), alors que dans d'autres, elle conduit à leur dégradation (Alwan and van Leeuwen, 2007).

V.B.5 Les enzymes de déubiquitination dans l'apoptose

De par leur implication dans de nombreuses voies cellulaires (Figure 22), la perturbation de l'activité de certaines DUBs va conduire à une mort cellulaire. Le plus souvent cette mort sera de type apoptotique et certaines DUBs sont particulièrement impliquées dans les mécanismes qui vont mener à la signalisation apoptotique.

Parmi les DUBs impliquées dans les voies de mort cellulaire, A20, déjà connue pour sa capacité à réguler NF- κ B et également capable de déubiquitiner la caspase 8. Ceci aura pour effet d'éviter son agrégation avec p62 et sa pleine activation, inhibant ainsi les signaux apoptotiques de la voie extrinsèque et la mort cellulaire (Jin et al., 2009). Une autre DUB impliquée dans la voie NF- κ B et capable de jouer un rôle dans l'apoptose est la DUB CYLD. En effet, l'une de ses cibles est RIPK1. La déubiquitination de RIPK1 a non seulement pour effet de bloquer l'activation de NF- κ B mais aussi de promouvoir la formation d'un complexe de signalisation pro-apoptotique incluant la caspase 8 et FADD (Wang et al., 2008). Ce complexe entrainera une apoptose de la cellule. De plus, des études récentes suggèrent que RIPK1 déubiquitinée et associée à RIPK3, va déclencher une nécroptose de la cellule lorsque l'activation des caspases est entravée (Vandenabeele et al., 2010; Vanlangenakker et al., 2011).

Au niveau de la famille des USP, USP7 a été identifiée comme une protéine oncogénique. En effet, elle est capable de déstabiliser ou d'inhiber plusieurs suppresseurs de tumeurs, p53, FOXO4 et PTEN, et d'augmenter les propriétés oncogéniques de la Claspine, une protéine impliquée dans les checkpoints de la réplication de l'ADN (Sacco et al., 2010). De même qu'USP7, les DUBs capables de réguler p53 tel qu'USP2 ou USP10 vont être très impliquées dans l'apoptose déclenchée par la voie p53.

USP19 est capable de déubiquitiner c-IAP1 et c-IAP2, deux protéines de la famille IAP (inhibitor of apoptosis) (Mei et al., 2011). Son action va permettre la diminution de la dégradation de ces deux protéines. c-IAP1 et c-IAP2 vont alors inhiber l'activation des caspases, l'apoptose et entraîner une augmentation du potentiel prolifératif des cellules où USP19 va être plus active.

Enfin, USP14 et UCH-L5, DUBs associées au protéasome et nécessaires à son bon fonctionnement, constituent de nouvelles cibles de l'inhibition du protéasome. Leur inhibition va entraîner une rapide mort cellulaire par apoptose (Liu et al., 2014; Tian et al., 2014). Ces DUBs ont un rôle crucial car elles peuvent perturber toute l'activité du protéasome, qui régule l'activité de nombreuses protéines liées aux mécanismes de mort cellulaire. En effet, les membres de la famille BCL-2 sont particulièrement sensibles à la dégradation par le protéasome. La dégradation de BCL-2 ou des membres de cette famille tel MCL-1, très présent dans les hémopathies malignes, va entraîner le relargage de signaux pro-apoptotiques et une mort par apoptose (Mojsa et al., 2014; Scarfo and Ghia, 2013). A l'inverse, l'inhibition complète du protéasome va également entraîner l'accumulation des membres pro-apoptotiques de la famille BCL (BAX, BAK, BAD, BIM, BIK et BID) et conduire à une augmentation de l'apoptose cellulaire (Li and Dou, 2000; Naujokat and Hoffmann, 2002).

Les enzymes de déubiquitination et le protéasome constituent donc des éléments cruciaux dans la régulation de la mort cellulaire. Leur perturbation dans les processus cancéreux conduit à l'inhibition des mécanismes de mort et l'augmentation des signaux de survie et de prolifération de la cellule cancéreuse. Ces enzymes sont donc d'un intérêt majeur dans l'élaboration de nouvelles pistes de traitement des cancers.

Objectifs

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) sont de plus en plus fréquents et représentent aujourd'hui le cinquième groupe de cancer au monde. Leur incidence est en constante augmentation et ces pathologies constituent un véritable problème de santé publique. Les LNH à cellules B matures regroupent un panel hétérogène de pathologies originaires de cellules lymphatiques (Rickert, 2013; Shankland et al., 2012). Parmi les LNH à cellules B matures, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la forme de leucémie de l'adulte la plus fréquente dans le monde occidental. Elle est caractérisée par l'accumulation de cellules B CD5+/CD23+ dans le sang, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes secondaires. Certains patients vont présenter des formes agressives de la maladie alors que d'autres seront atteints de formes indolentes ne nécessitant aucun traitement pendant plusieurs années. Cette variabilité est le reflet d'une hétérogénéité intrinsèque à cette maladie. Malgré de grandes avancées dans la compréhension de cette physiopathologie, la LLC reste à ce jour globalement incurable. Il est donc important de mieux comprendre la physiopathologie de la LLC, et plus largement des LNH, pour permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques, en particulier pour les patients résistants aux traitements conventionnels.

Les LNH à cellules B matures se caractérisent par un défaut d'apoptose résultant d'une combinaison de facteurs intrinsèques à la cellule, et de facteurs extrinsèques liés au microenvironnement des cellules leucémiques et conduisant à l'accumulation de cellules B cancéreuses.

Parmi les facteurs conduisant à la résistance à l'apoptose, la diminution des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (BAX, BAK, BAD, BIM, BIK et BID) et la stabilisation des membres anti-apoptotiques de cette famille tels BCL-2 et MCL-1 vont contribuer à l'agressivité de nombreuses hémopathies malignes (Mojsa et al., 2014; Scarfo and Ghia, 2013). Les signaux du microenvironnement et l'importance du BCR dans la surexpression des membres anti-apoptotiques de cette famille ont été clairement démontrés (Shain and Tao, 2014; ten Hacken and Burger, 2014). La régulation des protéines de la famille BCL-2 et notamment de MCL-1 est soumise à des mécanismes dynamiques impliquant l'ubiquitination de ces protéines et leur destruction par le système ubiquitine-protéasome. Ces dernières années, l'importance de la régulation des voies de survie cellulaire par le protéasome et les enzymes d'ubiquitination et de déubiquitination a été particulièrement mise en avant comme une nouvelle voie thérapeutique potentielle (Crawford and Irvine, 2013). Le premier objectif de ce travail de thèse consistait à déterminer quelles pouvaient être les enzymes de déubiquitination (DUBs) reliées à la signalisation du BCR, impliquées dans la survie exacerbée des cellules lymphoïdes B malignes et la stabilisation de la protéine anti-apoptotique MCL-1.

Une autre voie d'approche dans les traitements des LNH à cellules B matures cherche à outrepasser la résistance à la mort cellulaire et à déclencher pour permettre l'élimination des cellules cancéreuses. A ce titre, l'altération de la voie des sphingolipides peut se traduire par la mort cellulaire. En effet, les sphingolipides favorisent la mort cellulaire en modulant différentes voies de signalisation cellulaire dont PKC, PP1, JNK (Pitson et al., 2011). CD95L (Fas ligand) induit une augmentation du taux endogène de céramides qui induisent une apoptose dépendante de caspase 9 (Lafont et al., 2012). La

sphingosine peut provoquer une perméabilisation de la membrane lysosomale et la libération des protéases lysosomales dans le cytosol (Kagedal et al., 2001). Les sphingolipides interviennent aussi dans les mécanismes de mort en formant des macro-domaines dans la membrane mitochondriale externe au niveau des lesquels se polymérisent des protéines Bax pour créer des pores et une perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP) (Lee et al., 2011). Les sphingolipides sont donc impliqués dans l'apoptose intrinsèque et extrinsèque dépendante des mitochondries et peuvent entraîner également des morts cellulaires indépendantes des caspases. Le fingolimod ou FTY720, un sphingolipide analogue de la sphingosine, montre une action anti-néoplasique dans des modèles d'hémopathies malignes B et notamment la LLC (Liu et al., 2008). Cependant les mécanismes d'action du FTY720 restent encore mal connus et parfois contradictoires. Un autre objectif de ce travail a été de mieux caractériser l'effet cytotoxique du FTY720 en déterminant les mécanismes de mort cellulaire qu'il entraîne dans les cellules de LLC.

Résultats

I. Article : The deubiquitinating enzyme USP14 controls MCL-1 expression and lymphoma cell survival downstream B cell antigen receptor and stromal protective signals

Résumé

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) sont l'une des principales causes de mortalité par cancer dans le monde. Ces pathologies sont marquées par une signalisation aberrante en aval du récepteur des lymphocytes B (BCR) ainsi que par des signaux dérivés du microenvironnement qui vont contribuer à l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique MCL-1, favorisant la résistance à la mort cellulaire dans les cellules B malignes. MCL-1 est une protéine ayant une demi-vie très courte, soumise à une dégradation rapide par le système ubiquitine-protéasome (UPS). Plusieurs E3 ligases impliquées dans la dégradation de MCL-1 ont été identifiées. Toutefois, les enzymes capables de déubiquitiner MCL-1 pour le protéger de la destruction sont relativement peu connues. Dans notre étude nous avons étudié l'impact des signaux du BCR et du stroma sur l'activité des DUBs, l'expression de MCL-1 et la survie des cellules tumorales. Nos résultats montrent que la DUB USP14 associée au protéasome, représente un nouvel effecteur clé en aval des signaux protecteurs pro-oncogéniques du BCR et du microenvironnement stromal. Les DUBs et USP14 en particulier constituent une cible cliniquement pertinente pour l'élaboration de thérapies basées sur l'UPS dans les cellules B néoplasiques.

Article

The deubiquitinating enzyme USP14 controls MCL-1 expression and lymphoma cell survival downstream B cell antigen receptor and stromal protective signals

Nicholas Dubois^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Mathilde Versini³, Emilien Delmont^{1,3}, Pierre-Yves Jeandel³, Michel Ticchioni^{1,4}, Sophie Tartare-Deckert^{1,2}, and Marcel Deckert^{1,2}

¹ INSERM, U1065, C3M, Team Microenvironment, Signaling and Cancer, Nice, France ; ² University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, France ; ³ Department of Internal Medicine, and ⁴ Immunology Laboratory, CHU Nice, Hôpital Archet, Nice, France

Correspondence to: Marcel Deckert, INSERM UMR1065 / C3M, 151 Route de Ginestière BP 23194, F-06204 Nice cedex 3. Phone: 33 (0) 4 89 06 43 10 ; Fax: 33 (0) 4 89 06 42 21. E-mail: deckert@unice.fr

Abstract

B-cell non-hodgkin lymphoma (NHL) is one of the leading causes of mortality by cancer worldwide. Aberrant signaling downstream of the B-cell receptor (BCR) cooperates with microenvironment-derived signals to increase the expression of the anti-apoptotic protein MCL-1, thereby promoting cell death resistance in malignant B cells. MCL-1 is a short live protein subjected to rapid degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS). Whereas several ubiquitin ligases involved in the degradation of MCL-1 have been identified, how ubiquitinated MCL-1 is protected from destruction by deubiquitinases (DUBs) remains poorly understood. Here we have investigated the impact of BCR signaling and stromal protective signals on DUB activity and MCL-1 expression in NHL. Two general DUB inhibitors, WP1130 and HBX41108, showed a potent anti-tumoral activity in different NHL cell lines and in primary CLL cells, suggesting the participation of DUBs in malignant B cell viability. To identify the involved DUBs, we used a DUB trap assay, and we found that BCR stimulation and co-culture with stromal cells dramatically enhanced the pattern of active DUBs in malignant B cells. Biochemical approaches identified USP14 as a major DUB involved in the regulation of MCL-1 expression and neoplastic B cell survival downstream the BCR. Pharmacological and/or siRNA-mediated inhibition of SYK and BTK, which down-regulated MCL-1 and inhibited tumor cell survival, decreased BCR-dependent USP14 activity without affecting the proteolytic activity of the core proteasome. Inhibition of USP14 with IU1 or USP14 knockdown reduced MCL-1 levels and malignant B cell viability. Following BCR stimulation, USP14, MCL-1 and SYK co-localized with 19S proteasomes that were enriched at the BCR capping site. Finally, we show that inhibition of AKT decreased USP14 activity, MLC-1 expression, and cell survival. Together, our data show that the proteasome-associated DUB USP14 represents a novel key effector downstream of oncogenic BCR signaling and stromal protective signals, and a clinically relevant target for UPS-oriented therapies in mature B cell neoplasms.

Introduction

B-cell non-hodgkin lymphoma (NHL) is one of the most common cancers in Western countries. NHL forms a heterogeneous group of malignancies with various clinical, histopathologic and molecular features and variable responses to therapy. NHL may follow an aggressive or an indolent course, and patients who require treatment receive a combination of genotoxic drugs and/or immunotherapies. A significant percentage of NHL patients respond well to treatment. However, organ toxicities and relapses are frequently observed. Consequently, B-cell lymphoma/leukemia remains a considerable clinical challenge, and one of the leading causes of cancer mortality worldwide (1). One key molecular pathway that is common to most neoplastic B cells is the B-cell receptor (BCR) signaling pathway. In normal B lymphocytes, signals from the BCR bound to its cognate antigen activate downstream pathways involved in B-cell development, proliferation, survival and differentiation (1,2). BCR engagement triggers a rapid phosphorylation of BCR ITAMs and activation of the non-receptor protein tyrosine kinases (PTKs) LYN (a Src family member), spleen tyrosine kinase (SYK) and Bruton tyrosine kinase (BTK), as well as effector enzymes, such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase C (PKC) isoforms, and phospholipase C γ 2 (PLC γ 2). These proteins assembled through multiple adaptor proteins and membrane lipids form signaling complexes that regulate the activity of distal pathways (Ras/MAPK, AKT/mTOR, NF κ B, NFAT), whose activities dictate gene transcription and B cell fate. Importantly, B cell development and mature B cell survival also implicate antigen-independent but ITAM-dependent “tonic” BCR signaling (3).

In B-cell malignancies, number of studies have shown that molecular pathways similar to either active or tonic BCR signaling can drive cancer cell proliferation, growth, survival, and therapeutic resistance (1,4-6). As such, small molecules targeting proximal kinases of BCR signaling, including PI3K, SYK and BTK are now under clinical evaluation in lymphoma and chronic lymphocytic leukemia (CLL) (1,7). Importantly, these drugs may also be active in targeting signals emanating from the malignant B cell microenvironment, which enhance survival and therapeutic resistance (8-10) (11).

Increased cell viability and resistance to apoptotic stimuli are considered as central events participating to the development of B-cell malignancies. At the molecular level, these pathological

processes, supported by the combination of BCR signaling events, tumor-host interactions, and genetic and epigenetic mutations, are frequently associated with a high expression of anti-apoptotic molecules, including members of the BCL-2 family that control the mitochondrial pathway of apoptosis (12). MCL-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) is an essential survival protein in multiple cellular lineages, which can suppress apoptosis by blocking the action of BH3-only pro-apoptotic proteins (13). MCL-1 is found overexpressed in several human cancers, including hematological malignancies. In particular, elevated expression of MCL-1 in B-cell lymphoma, CLL and multiple myeloma (MM) is correlated to therapeutic resistance and disease progression (14-18).

A large number of molecular pathways regulate MCL-1 transcription, translation, and proteolysis. However, unlike BCL-2 or BCL-X_L, MCL-1 has a very short half-life resulting from ERK and GSK3-mediated phosphorylation and ubiquitinylation that target MCL-1 for a rapid degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS) (19,20). UPS is a major protein degradation system involved in pathological processes such as viral infections, inflammation and cancer (21). Clinical relevance of targeting the UPS in cancer is illustrated by bortezomib, a proteasome inhibitor approved for second-line treatment of multiple myeloma and refractory mantle cell lymphoma (22,23). Upstream molecular events involved in MCL-1 degradation by the UPS include the SYK-PI3K-AKT survival pathway, which decreases GSK3 activity in B-cell malignancies (24-26). Several enzymes involved in the ubiquitination and degradation of phosphorylated MCL-1 have been identified: the E3 ubiquitin ligases HUWE1 (27), β -TrCP (28), SCF^{FBW7} (29), and Trim17 (30). The reverse enzymatic reaction that removes or modifies ubiquitin conjugates is catalyzed by a class of ubiquitin-specific peptidases: the deubiquitinating enzymes or DUBs (31). Because DUBs activity may affect the expression of cancer-associated proteins, their targeting constitutes a promising new therapeutic approach in oncology. Deubiquitination of MCL-1 by ubiquitin specific peptidase 9 X-linked (USP9X) was reported to regulate MCL-1 stability in some cancers such as MM (32), but not in pancreatic cancer (33). Therefore, it is still unclear how exactly ubiquitinated MCL-1 is protected from destruction by DUBs. Furthermore, the nature of the DUBs that are regulated downstream malignant B-cell signaling pathways remains unknown.

In this study, we have investigated the impact of BCR and stromal-derived signaling on DUB activity in B-cell lymphoma and CLL cells. We demonstrate that BCR stimulation and stroma co-

culture activate several DUBs in malignant B cells, including the proteasome-associated DUB, USP14. Pharmacological and siRNA-mediated inhibition of USP14 reduced MCL-1 levels and tumor cell survival. USP14 activity was regulated by SYK, BTK, and AKT, indicating that USP14 represents a novel key effector downstream of BCR signaling and stromal protective signals in mature B cell neoplasms.

Materials and methods

Patients, cell isolation and culture

The human chronic lymphocytic leukemia cell line MEC1 was from DSMZ (Germany). The human leukemia T cell line Jurkat, Burkitt lymphoma Ramos, follicular lymphoma RL and DOHH2, bone marrow stromal cell HS-5 and embryonic kidney fibroblast 293-T were from the American Type Culture Collection (ATCC). CLL cells were obtained at the Centre Hospitalier Universitaire of Nice from peripheral blood samples of 44 CLL patients after informed consent. The diagnosis of CLL was based on clinical and immunophenotypic criteria. All patients included in this study were either untreated or had not received chemotherapy or steroids for at least 6 months before the investigation. Peripheral mononuclear cells were isolated from peripheral blood by Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation. Leukemic B cells were isolated by magnetic selection as previously described (25,34). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Paisley, UK) containing 10% FCS (Hyclone, Logan, UT, USA), 1mM pyruvate, 25mM hepes and non-essential amino acids (all from Gibco BRL, Paisley, UK). HS-5 and 293-T were cultured in DMEM medium (Gibco BRL, Paisley, UK) containing 10% FCS. Co-cultures of CLL with HS-5 are performed in 24 wells. 50 000 HS-5 are plated in wells and 1ml of RPMI-1640 medium containing 10% FCS, 24h before the beginning of the co-culture. 10⁶ CLL cells are added with 1 ml of RPMI-1640 medium containing 10% FCS and cells were co-cultured during 48h.

Reagents, antibodies, plasmids and siRNA

BAY61-3606, staurosporin, Doxorubicine, Cyclosporin A, Cycloheximide and MG-132 were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MI, USA). WP1130 was purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Anti-IgM was purchased from Southern Biotech (Birmingham, AL, USA). IU1 was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Ibrutinib, Dasatinib and MKK2206 were purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA). QVD-OPH was from MP-Biomedicals (Aurora, OH). Antibodies against HA and XIAP were from Sigma Aldrich (St Louis, MI, USA). Antibody against USP9X was from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). Antibody against P-Src were from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Antibodies against MCL-1, HSP90, USP14, BCL-2, ERK2 and SYK were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies against XIAP, Pan AKT, P-AKT, P-PRAS, P-GSK3 α/β , P-SYK and HRP conjugated secondary antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). The plasmid encoding FLAG-USP14 was from Addgene (Cambridge, MA, UK). MCL-1 and AKT1/2 siRNA were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). SYK siRNA was from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). USP14 and USP9X siRNAs were purchased from Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). USP14 PCR was performed using the following oligonucleotide primers: forward, ATGGGTGAAAAGGAAACAAGATGA ; reverse, GAACGTAAGCGATATGCCAGTCT.

Analysis of apoptosis by flow cytometry

Apoptosis was evaluated by flow cytometry following double staining with annexin-V-FITC and 7-AAD (eBiosciences) as previously described (25,34).

MTS (viability) assay

CML cells were seeded in 96-well plates (5×10^4 cells/well) and treated with different reagents for the indicated times and incubated at 37°C. The viability is observed by measurement of LDH release using the CytoTox-ONE homogeneous membrane integrity assay as recommended by the manufacturer (Promega). The optical density of each sample at 490nm was determined with a Multiskan FC plate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

Cell transfection

Plasmid transfections into Jurkat cells were performed by electroporation (270mV, 975 μ F) using a Gene Pulser system (Bio-Rad Laboratories). Transfected cells were transferred to 37°C preheated medium and after 24 hrs at 37°C, 5% CO₂. Transient transfections were performed using the AMAXA nucleofection system (AMAXA GmbH, Koln, Germany) as described previously (Ticchioni et al., 2007). Briefly, cells were resuspended in 100 ml of Buffer V, mixed with 2 mM of siRNA duplex, electroporated using program U-013 for B-CLL, X-005 for Jurkat and O-006 for Ramos incubated at 37°C, 5% CO₂ before treatment. Transient transfections in 293-T were performed with Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) following manufacturer instructions.

Immunoblot and Immunoprecipitation analysis

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analyses were performed as previously described (25).

Ub-AMC protease assay

Cells were lysed in ice-cold DUB buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 0,2% Triton X-100 and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride by mild sonication. Briefly, 3 μ g of clarified lysate were incubated with 500 nM Ub-AMC (R&D systems, Minneapolis, MN) in a 100 μ L reaction volume at 37°C, and the release of AMC fluorescence per minute was recorded at excitation/emission of 380/460 nm using a spectrofluorometer.

Labeling of Cell Extracts with HA-Ubiquitin

Cells were harvested, washed with PBS, and lysed in ice-cold buffer containing 50mM Tris (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, 1 mM DTT, and 1 mM ATP by mild sonication. Nuclei, membranes, and intact cells were removed by centrifugation, and 20 μ g of clarified protein extract corresponding to 2×10^6 cells was incubated for 25 min at 37°C with HAUbVS (R&D systems, Minneapolis, MN). After boiling in reducing sample buffer, the cell lysates were blotted to polyvinylidene difluoride membranes and probed with an anti-HA antibody.

Proteasome activity assay

Fluorogenic Suc-LLVY-AMC substrate (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) was used to assay for chymotryptic-like activity of the 20S proteasome. Ramos cells were treated with different reagents for the indicated times or MG132 (10 μ M) for 2h (and only 30 min with IgM). The cells

were lysed in ice-cold lysis buffer [50 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100], and their lysates were clarified by centrifugation at 20,000 RCF for 10 minutes. Equal amounts of protein from each sample were then incubated at 37°C with 100 μM fluorogenic substrate. Fluorescence intensity was measured during 1h using a spectrophotometer at excitation of 360 nm and emission of 460 nm. Assays were performed in triplicate, and statistical significance was determined with a paired Student's t test.

Fluorescence microscopy

Ramos cells were seeded onto sterile chamber slide and treated with different reagents for the indicated times at 37°C. Cells were rinsed briefly in PBS, fixed in PBS containing 3% formaldehyde, and incubated in a solution containing 0.2% saponin and 1% BSA in PBS with primary antibodies (anti-USP14 and anti-MCL-1 1:500, Santa Cruz Biotechnology) overnight at room temperature. Cells were washed, incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000; Molecular probes), washed again, and mounted in Mowiol. For nuclear staining, fixed cells were incubated with Hoescht (1:1000, Merck Millipore) for 5 min at room temperature. Images were captured on a Zeiss LSM 510 META laser scanning confocal microscope, with sequential fluorophore excitation.

Real Time Quantitative PCR

Total RNA was extracted from Ramos cell samples using Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and following the manufacturer's instructions. Recovered RNA samples were quantified using NanoDrop spectrophotometer ND1000 (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed on 0.5 μg of total RNA in a volume of 20 μL using High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed on 25 ng cDNA samples, in sealed 96-well microtiter plates using the Platinum® SYBR Green qPCR Supermix-UDG w/ROX (Life Technologies) with the StepOnePlus System (Applied Biosystems). The relative expression level of target genes mRNA between control (X) and sample (Y) was calculated using the formula $\Delta C_T Y - DC_T X$ and expressed as fold over control ($2^{\Delta\Delta C_T}$).

Statistical analysis

The nonparametric Wilcoxon's signed rank test for paired measures was used to evaluate variations in leukemic cell viability following pharmacological or siRNA treatment. The Mann-Whitney U-test was used to evaluate differences in cell viability, Ubiquitin and proteasome assay. Statistical analyses were performed using the Graph Pad software.

Results

Pharmacologic inhibition of DUB activity induces cell death in B-cell malignancies

To investigate the role of DUBs in malignant B-cell survival, we first addressed the effect of the DUB pharmacological inhibitor WP1130 on primary CLL cells obtained from 5 patients using flow cytometry combined to Annexin V/7-AAD staining. In all patient cells tested (n=5), WP1130 induced cell death at concentrations ranging from 0.1 to 5 μM, with a maximal cytotoxicity obtained for concentration between 2 and 5μM (Figure 1A). A time course of cell death induction

with increasing doses of WP1130 showed that maximal cytotoxicity was reached at 24 hours and 2 μ M of the drug (Figure S1). We next cultured B-cell NHL cell lines with different histopathologic origin (the Burkitt lymphoma Ramos, the CLL line MEC1, and two follicular lymphomas RL and DOHH2) with increasing concentrations of WP1130 and a second pharmacological inhibitor of DUB, HBX41108, and measured cell viability. As shown in Figure 1B and C, the two drugs displayed a strong cytotoxic activity at concentrations between 10 and 20 μ M in all 4 tested lymphoma cell lines. The effect of WP1130 on the ubiquitin-specific proteolytic activity of DUB was then assessed using the fluorogenic DUB substrate ubiquitin-AMC on cell lysates obtained from different NHL cell lines and CLL cells treated 6h with WP1130 (10 μ M). Figure 1D shows that treatment with WP1130 led to a marked reduction of DUB activity in all 4 tested lymphoma cell lines and in primary CLL cells from patients (n=5). These results show that B-cell malignancies, including CLL, display a “tonic” DUB activity that is required for cell survival.

BCR stimulation enhances DUB activity in B-cell malignancies

In addition to “tonic” viability, B-cell malignancies rely on active BCR signaling for driving their survival (1). We therefore examined the impact of BCR stimulation on DUB activity. Ramos cells were treated during 30 min with anti-IgM antibodies and monitoring DUB activity on cell lysates using the ubiquitin-AMC substrate showed that BCR engagement increased DUB activity by more than 50% (Figure 2A). To confirm this observation, we used a DUB TRAP assay based on a probe composed of a HA-tagged ubiquitin linked to a vinyl-sulfone reactive group that covalently binds to active DUBs in cell lysates (35). Lysates were then subjected to anti-HA immunoblot analysis that revealed the pattern of DUB activity. As shown in Figure 2B, anti-IgM stimulation induced an early (5 min) and time-dependent increase of DUB activity in Ramos cells. Augmentation of DUB activity following BCR stimulation paralleled the kinetics of activation of BCR-associated signaling molecules, including SYK, BTK, AKT, and ERK. Among the candidate DUBs showing an increase in activity upon BCR cross-linking, we confirmed the presence at 190 kDa of USP9X, a proposed DUB for MCL-1 (32) (data not shown). However, when we knockdown USP9X in different cell types, including CLL cells, Ramos B lymphoma, and Jurkat T cell leukemia, no significant change in MCL-1 expression was observed (Figure S2). An immunoblot screening of other candidate DUBs revealed a band corresponding to USP14 (36) covalently coupled to HA-Ub, indicating that

the activity of this proteasome-associated DUB was dramatically increased by BCR stimulation (Figure 2C).

Inhibition of USP14 activity reduces MCL-1 expression and survival of B cell neoplasms

Active and tonic BCR signaling requires the two proximal PTKs, SYK and BTK that control distal molecular events involved in cancer B cell growth and survival (Young and Staudt, NRDD 2013 12:229). We found that the pharmacological inhibition of SYK (BAY61-3606) (25) or BTK (Ibrutinib) (37) strongly reduced both tonic and BCR-stimulated DUB activity in B cell lymphoma (Figure 3A). A DUB TRAP assay performed on lysates obtained from BCR-stimulated lymphoma cells treated or not with BAY61-3606 or Ibrutinib further showed that inhibition of BCR signaling, which totally down-regulated MCL-1 expression, also abrogated tonic and BCR-stimulated USP14 activity (Figure 3B). In contrast, Dasatinib treatment (a Src-family inhibitor) had no detectable effect on MCL-1 levels and USP14 tonic activity (Figure S3). The immunoreactive band was indeed USP14-Ub-HA as revealed by immunoprecipitating USP14 from DUB TRAP assays performed on lysates obtained from cells that have been left untreated or treated with the SYK inhibitor BAY61-3606, and the two DUB inhibitors WP1130 and IU1 (Figure 3C). IU1 has been described as an USP14 inhibitor (38). We therefore examined how this drug affected malignant B cell survival. We found a dose-dependent effect of IU1 on the tonic activity of USP14 in lymphoma cells, with a maximal effect reached between 100 and 250 μ M. These concentrations of IU1 that are consistent with a previous study (38) led to a complete extinction of MCL-1 (Figure 4A). A similar dose effect of IU1 was found on the viability of the two cell lines Ramos and MEC1 (Figure 4B) and primary CLL cells obtained from 3 patients (Figure 4C). In order to sustain the data obtained with pharmacological inhibitors of USP14, we used nucleofection to knockdown USP14 in malignant B cells. As shown in Figure 5A, the depletion of USP14 in Ramos cells resulted in a strong reduction of MCL-1, but not BCL-2 expression, and impaired cell viability, that reached levels comparable to the effect of MCL-1 knockdown (Figure 5A). Similarly, siRNA-mediated depletion of USP14 in CLL cells significantly decreased both MCL-1 protein levels and leukemic cell viability (Figure 5B and C). Interestingly, silencing or overexpressing USP14 resulted, respectively, in downregulation or upregulation of MCL-1 in Jurkat leukemic T cells (Figure S4). Together, these data demonstrate that USP14 functions to regulate MCL-1 expression and survival in malignant lymphocyte.

USP14 activity is regulated by a SYK-AKT pathway in malignant B cells

We next addressed the mechanisms involved in USP14 activity in malignant B cells. SYK and DUB inhibition had no effect on the levels of total USP14 protein (Figure 6A) and USP14 mRNA (Figure 6B), while the two treatments completely prevented the presence of the active Ub-HA-tagged form of USP14 (Figure 6A). To confirm that SYK is involved in USP14 activation downstream BCR, we used nucleofection to silence SYK in unstimulated Ramos cells. Under conditions that resulted in a significant reduction of SYK levels and cell viability, we observed the disappearance of MCL-1, together with a strong decrease of the active Ub-HA-tagged form of USP14 (Figure 6C). Of note, SYK knockdown did not affect BCL-2 levels in transfected lymphoma cells. We next assessed whether SYK silencing could also modify the activation of USP14 by BCR stimulation. Ramos cells transfected with control or SYK siRNAs were treated or not with anti-IgM during 30 min at 37°C, and a DUB TRAP assay was performed on cell lysates, followed by immunoblot analysis. As shown in Figure 6D, the depletion of SYK abrogated the activation of USP14 induced by BCR cross-linking on B lymphoma cells. Because SYK appears to regulate USP14 activity, we also wondered whether SYK could interact with USP14 in malignant B cells. Co-immunoprecipitation studies failed to demonstrate a physical interaction between SYK and USP14 (data not shown). However, co-immunolocalization with fluorescence microscopy revealed that BCR stimulation triggered the relocation of USP14 and SYK within the cap structure that forms following BCR cross-linking. Importantly, SYK inhibition abolished the co-localization of SYK and USP14 induced by BCR stimulation (Figure 6D). In malignant B cells, BCR signaling through SYK promotes a survival pathway that involves AKT-mediated stabilization of MCL-1 (24-26). To examine the role of AKT on USP14 activity, we treated Ramos cells with MKK2206, a potent allosteric AKT inhibitor (REF) for 6h at 37°C. We found that AKT inhibition reduced tonic DUB activity and lymphoma cell viability to levels comparable to that achieved by SYK inhibition (Figure 7A). A DUB TRAP assay performed on lysates obtained from BCR-stimulated lymphoma cells treated or not with MKK2206 showed that AKT inhibition also blocked the activation of USP14 by BCR (Figure 7B). The effect of MKK2206 on USP14 inhibition correlated with the inhibition of AKT phosphorylation and AKT effectors (including PRAS and GSK3), and with the down regulation of MCL-1. In addition, siRNA-mediated depletion of AKT1/2 that abolished the expression of MCL-1 also diminished the presence of the active HA-Ub-tagged form of USP14 in

Ramos B lymphoma cells (Figure 7C). These data indicate that a SYK-AKT pathway regulates USP14 activity in malignant B cells. Interestingly, a similar regulation of USP14 by AKT was also observed in Jurkat leukemic T cells (Figure S6).

USP14, MCL-1 and 26S Proteasome co-localized under BCR stimulation

Several studies have identified USP14 as one of the DUBs that are associated to 19S proteasome (36). USP14 activation requires its interaction with the proteasome (36), and the binding of ubiquitinated proteins to USP14 enhances the hydrolytic activity of the proteasome (39). Our observations thus suggest a possible regulation of the proteasome activity by the BCR via USP14. Therefore we examined how SYK and BTK inhibition affect proteasome activity upon BCR engagement. Ramos cells that were treated with Ibrutinib, BAY61-3606 and MG132 for 2h at 37°C, were stimulated with anti-IgM for 30 min. The proteasome activity was monitored on cell lysates using the 20S fluorometric substrate Suc-LLVY-AMC. As shown in Figure 8A, BCR stimulation resulted in a small but significant increase in 20S proteasome activity that was blocked following SYK and BTK inhibition. In contrast, BCR signaling inhibition failed to modify the basal MG132-sensitive activity of the proteasome. The analysis of the 19S proteasome subunit localization using immunostaining with anti-S7 antibody and fluorescence microscopy further showed that BCR stimulation led to co-localization of USP14 and 19S proteasome within the BCR-induced cap structure (Figure 8B). Although SYK and BTK inhibition prevented the formation of the cap structure induced by the BCR stimulation, SYK and BTK inhibition did not abrogate the association of USP14 with the 19S proteasome. Finally, as shown in Figure 8C, BCR cross-linking led to the localization of a significant fraction of MCL-1 with USP14. Blocking SYK and BTK activities in BCR-stimulated lymphoma cells decreased the co-localization of MCL-1 and USP14 (Figure 8C).

Stromal protective signals enhance DUB activity in B-cell malignancies

Tumor B-cell microenvironment promotes cancer cell survival and MCL-1 up-regulation (8,11). We therefore examined the impact of stromal cell-derived signals on DUB activity in primary CLL cells. As shown in Figure 9A, when CLL cells were co-cultured with the bone-marrow fibroblast cell line HS-5 for 2 days, a significant increase in DUB activity that paralleled leukemic cell survival was observed. A DUB TRAP assay performed on lysates obtained from CLL cells co-

cultured or not with HS-5 stromal cells further showed that stromal signals dramatically enhanced both MCL-1 expression and DUB activity (Figure 9B). Anti-USP14 immunoblot further confirmed that the DUB activity of USP14 was increased by the protective signals from stromal cells (Figure 9C).

Discussion

The development of B-cell malignancies involves a combination of BCR signaling events, tumor-microenvironment interactions and genetic mutations. These events enhance cancer cell survival, disease progression and therapeutic resistance through the modulation of the expression of proteins of the BCL-2 family (12). In line with these findings, targeting malignant B-cell signaling and survival pathways has become a successful therapeutic strategy. A central player in hematological malignancies is MCL-1, an anti-apoptotic protein that is subjected to rapid proteasomal degradation (20,25). Understanding the mechanisms by which BCR and stroma-derived survival signals regulate MCL-1 ubiquitination and destruction is thus essential for the development of novel anticancer strategies.

Unlike other anti-apoptotic BCL-2 family members, MCL-1 contains in its N-terminal domain a PEST region and multiple phosphorylation and ubiquitylation sites that contribute to its rapid proteasomal degradation (40). In particular, the ability of E3 ubiquitin ligases, such as FBW7, to ubiquitylate MCL-1 is dependent on ERK and GSK3-mediated phosphorylation of MCL-1 within its PEST domain (19,20). In NHL and CLL, upstream molecular events involved in MCL-1 degradation include the BCR-regulated SYK-PI3K-AKT survival pathway, which prevents GSK3 activation in B-cell malignancies (25,26). On the other hand, MCL-1 degradation can be antagonized by the action of deubiquitylating enzymes. In recent years, DUB inhibition by small molecules such as WP1130 or HBX41108 has emerged as a promising novel strategy in cancer therapy ((41). Although initially developed as a HAUSP/USP7 inhibitor, HBX41108 is now considered as a general DUB inhibitor, which, like WP1130, induces malignant cell apoptosis (41-43). In our study we found that the two drugs, which block DUB activity in unstimulated B-cell lymphoma cell lines and in primary CLL cells, display a potent cytotoxicity, accompanied by a dramatic depletion of MCL-1. Similar to what has been described for other cancers, we found that WP1130 induces cell death displaying typical features of apoptosis (data not shown). These results

indicate that a “tonic” DUB activity is required for MCL-1 stabilization and malignant B cell survival.

Antigen-dependent (or active) BCR signaling and protective signals from the tumor microenvironment are critical for driving the survival of mature B cell neoplasms and therapeutic resistance (1,44). We thus hypothesized that the signals issued by the malignant B cell microenvironment may affect the activity of DUBs involved in MCL-1 accumulation and tumor cell resistance to apoptosis. Indeed, we found that BCR engagement induces a rapid activation of DUB activity with the same kinetics observed for enzymes, including SYK, BTK, AKT and ERK that are implicated in early BCR signaling. Importantly, the inhibition of SYK and BTK in intact lymphoma cells affected the activation by BCR cross-linking of several DUBs, pointing to an important role of DUB activity in malignant B cell activation. One important DUB that we then identified downstream both “tonic” and “active” BCR signaling is USP14, a cysteine protease from the ubiquitin specific peptidase (USP) family (31,36). USP14 activation requires its interaction with the proteasome (36), and the binding of ubiquitylated proteins to USP14 enhances the hydrolytic activity of the proteasome (39). In addition, USP14 affects the final degradation of poly-ubiquitylated proteins by the editing of ubiquitin conjugates into short chains that are not recognized by the proteasome. Target proteins are thus released and escape from destruction (36,45,46). Interestingly, a recent study reported that targeting proteasome-associated DUBs with a small molecule inhibitor of USP14 and UCHL5 induced growth arrest and apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomid resistance (47). Whether other proteasome-associated DUBs involved in the trimming of ubiquitin chains, such as UCHL5, are activated downstream the BCR is currently unknown. Nevertheless, our findings suggest that one key event downstream BCR involves the dynamic and signal-dependent regulation of proteasomal degradation.

One biological process that is affected by USP14 activity in malignant B cells is cell death susceptibility. Using a small molecule inhibitor of USP14, IU1 (38), we observed that USP14 activity is required for the viability of lymphoma B cell lines and primary CLL cells. IU1 was initially identified as a USP14 inhibitor that accelerated the degradation of oxidized proteins by the proteasome, thereby enhancing the resistance to oxidative stress (48). However, in malignant B cells, the inhibition of USP14 activity by IU1 decreased cell viability and is accompanied by a dramatic and rapid reduction of MCL-1 at the protein level. In order to confirm the pharmacological experiments, we used short interfering RNA to knockdown USP14 in B cell lymphoma. We were

able to demonstrate that a decreased expression of USP14 is sufficient to induce tumor cell death and the down-regulation of MCL-1, but not of BCL-2. Conversely, overexpression of USP14 in leukemic cells increased MCL-1 levels, suggesting that USP14 directly controls MCL-1 proteasomal degradation. This notion is further supported by the observation that upon a short BCR stimulation, USP14 and MCL-1 co-localized with 19S proteasome. However, additional experiments are needed to demonstrate that USP14 is a direct DUB of MCL-1 downstream BCR signaling. One DUB of MCL-1, USP9X has been reported to in some cancers (32), but not in others (33). Similarly, USP9X knockdown in primary CLL cells, Ramos B lymphoma, and Jurkat T leukemia failed to affect MCL-1 expression in our study. It is clear that the mechanisms of MCL-1 deubiquitylation require further investigation. Our findings, which suggest USP14 as an additional DUB for the oncoprotein MCL-1, may thus have important impacts in the understanding of cancer biology.

USP14 exists in a cytosolic inactive form in the cell. Upon binding to the proteasome, USP14 is activated (36). In malignant B cells, a short BCR stimulation (30 min) led to the relocation of USP14, MCL-1 and the 19S proteasome under the cap structure formed by cross-linked IgM, suggesting that USP14 is activated by BCR signaling pathway. Interestingly, BCR engagement, which triggered the association of USP14 with the proteasome, resulted in a significant increase of the proteasomal activity measured by the cleavage of Suc-LLVY-AMC. Under these conditions, a dramatic increase of USP14 activity was detected, together with a small, but significant up-regulation of MCL-1. Importantly, all these events were abrogated when BCR signaling was blocked by the inhibition of SYK and BTK. A molecular scenario emerging from these observations is that following BCR stimulation, USP14 translocates to the proteasome where it becomes activated and starts trimming ubiquitin chains on proteins, such MCL-1, that are otherwise set for proteasomal degradation. USP14 has several reported substrates, including CXCR4 (49), I κ B (50), Dishevelled (51), and β -catenin (52). Whether USP14 also regulates these pathways in B cell malignancies remains unknown. Nevertheless, the role that MCL-1 and these proteins play in tumor cell migration, survival and proliferation further underscores the importance of USP14 in the development of mature B cell malignancies.

How USP14 is activated downstream BCR signaling remains unclear. In particular, we need to determine whether the relocation of USP14 to the proteasome is sufficient to activate its enzymatic activity or whether it also requires signal-induced post-translational modifications. The latter

hypothesis is supported by the fact that pharmacological and siRNA-mediated inhibition of AKT decreased USP14 activity and MCL-1 expression. AKT is a critical effector of the PI3K survival pathway in malignant B cells that directly regulates the proteasomal degradation of MCL-1 (1,24,25). Of note, USP4, a proto-oncogenic DUB involved in the degradation of TGF- β type 1 receptor in breast cancer cells, is activated by AKT (53), suggesting that DUB regulation by AKT is a general mechanism. The promotion of USP14 activity by AKT may offer the possibility to control the two arms of MCL-1 degradation pathway downstream of the BCR: on one side, prevention of its ubiquitinylation through AKT-mediated inhibition of GSK3; on the other side, increased deubiquitinylation of MCL-1 through AKT-mediated activation of USP14. The inhibition of USP14 in unstimulated cells also resulted in MCL-1 depletion, therefore implying the existence of a “tonic” USP14 activity (and possibly other proteasome-associated DUBs) in B cell lymphoma and CLL cells. Constitutive activation of the PI3K/AKT pathway is a hallmark of “tonic” BCR signaling (1). It is thus likely that AKT controls both “active” and “tonic” pathways leading to USP14-regulated proteasomal activities. To this regard, it would be interesting to examine the effect of GS1101, a phase 1 oral agent that targets PI3K δ , on USP14 activities in NHL cells. Finally, USP14 was found to co-localize with SYK upon BCR stimulation. Whether USP14 represents a new partner and/or substrate of SYK is currently examined.

In conclusion, we report here that BCR and stroma-dependent activation of the deubiquitinating enzyme USP14 represents a novel key event in promoting the up-regulation of MCL-1 and the survival of malignant B cells. Clinically, proteasome inhibition has emerged as a new therapeutic option for the treatment of cancer, as illustrated by the use of bortezomib in hematological malignancies. Targeting ubiquitin-specific proteases may provide additional and more selective options to modulate the UPS in aggressive and resistant tumors. In this context, our finding that BCR signaling regulates several DUBs, including the proteasome-associated DUB USP14, may prove useful for the development of future therapeutics to tackle mature B cell malignancies.

Abbreviations

NHL, Non-hodgkin lymphoma ; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MM, multiple myeloma ; BCR, B-cell receptor; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; PTK, protein tyrosine kinase ; PI3K, phosphatidyl 3-kinase; GSK-3, Glycogen synthase kinase-3; MCL-1, myeloid cell leukemia sequence 1; UPS, ubiquitin-proteasome system; DUB, deubiquitinase; USP,

ubiquitin-specific protease ; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; siRNA, small interfering RNA

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and grants from Association Laurette Fugain and Fondation ARC. N.D. was a recipient of PhD fellowships from Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche and from Fondation ARC. We thank Christine Bezombes (CRCT, Toulouse) for follicular lymphoma cell lines, and Damien Alcor (INSERM U1065/C3M, Nice, France) for assistance with confocal microscope.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

1. Young, R. M., and Staudt, L. M. (2013) Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 229-243
2. Monroe, J. G. (2006) ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* **6**, 283-294
3. Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., DePinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L., and Rajewsky, K. (2009) PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* **139**, 573-586
4. Rickert, R. C. (2013) New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* **13**, 578-591
5. Duhren-von Minden, M., Ubelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M. P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Kohler, F., Wardemann, H., Zirlik, K., Veelken, H., and Jumaa, H. (2012) Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* **489**, 309-312
6. Schmitz, R., Young, R. M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A. L., Hodson, D. J., Buras, E., Liu, X., Powell, J., Yang, Y., Xu, W., Zhao, H., Kohlhammer, H., Rosenwald, A., Kluin, P., Muller-Hermelink, H. K., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Olgwang, M. D., Reynolds, S. J., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Pittaluga, S., Wilson, W., Waldmann, T. A., Rowe, M., Mbulaitaye, S. M., Rickinson, A. B., and Staudt, L. M. (2012) Burkitt lymphoma

- pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* **490**, 116-120
7. Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2010) From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **10**, 37-50
 8. Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A., and Caligaris-Cappio, F. (2009) The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* **114**, 3367-3375
 9. Buchner, M., Baer, C., Prinz, G., Dierks, C., Burger, M., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Jumaa, H., Veelken, H., and Zirlik, K. (2010) Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **115**, 4497-4506
 10. de Rooij, M. F., Kuil, A., Geest, C. R., Eldering, E., Chang, B. Y., Buggy, J. J., Pals, S. T., and Spaargaren, M. (2012) The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**, 2590-2594
 11. ten Hacken, E., and Burger, J. A. (2014) Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res* **20**, 548-556
 12. Letai, A. G. (2008) Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* **8**, 121-132
 13. Willis, S. N., and Adams, J. M. (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current opinion in cell biology* **17**, 617-625
 14. Cho-Vega, J. H., Rassidakis, G. Z., Admirand, J. H., Oyarzo, M., Ramalingam, P., Paraguya, A., McDonnell, T. J., Amin, H. M., and Medeiros, L. J. (2004) MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* **35**, 1095-1100
 15. Khoury, J. D., Medeiros, L. J., Rassidakis, G. Z., McDonnell, T. J., Abruzzo, L. V., and Lai, R. (2003) Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *The Journal of pathology* **199**, 90-97
 16. Pepper, C., Lin, T. T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., Austen, B., Hooper, L., Stankovic, T., and Fegan, C. (2008) Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* **112**, 3807-3817
 17. Gandhi, V., Balakrishnan, K., and Chen, L. S. (2008) Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood* **112**, 3538-3540
 18. Awan, F. T., Kay, N. E., Davis, M. E., Wu, W., Geyer, S. M., Leung, N., Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Secreto, C. R., Lin, T. S., Grever, M. R., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Call, T. G., Heerema, N. A., Lozanski, G., Byrd, J. C., and Lucas, D. M. (2009) Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood* **113**, 535-537
 19. Domina, A. M., Vrana, J. A., Gregory, M. A., Hann, S. R., and Craig, R. W. (2004) MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* **23**, 5301-5315
 20. Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., and Green, D. R. (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* **21**, 749-760

21. Finley, D. (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* **78**, 477-513
22. Orłowski, R. Z. (2004) Bortezomib in combination with other therapies for the treatment of multiple myeloma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **2 Suppl 4**, S16-20
23. Goy, A., Bernstein, S. H., Kahl, B. S., Djulbegovic, B., Robertson, M. J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J. P., Lonial, S., Nasta, S., O'Connor, O. A., Shi, H., Boral, A. L., and Fisher, R. I. (2009) Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol* **20**, 520-525
24. Longo, P. G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D. G. (2008) The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **111**, 846-855
25. Baudot, A. D., Jeandel, P. Y., Mouska, X., Maurer, U., Tartare-Deckert, S., Raynaud, S. D., Cassuto, J. P., Ticchioni, M., and Deckert, M. (2009) The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* **28**, 3261-3273
26. Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P. G., Carsetti, L., Berno, V., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D. G. (2009) Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* **23**, 686-697
27. Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* **121**, 1085-1095
28. Ding, Q., He, X., Hsu, J. M., Xia, W., Chen, C. T., Li, L. Y., Lee, D. F., Liu, J. C., Zhong, Q., Wang, X., and Hung, M. C. (2007) Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* **27**, 4006-4017
29. Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R. S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A. W., Xiao, Y., Christie, A. L., Aster, J., Settleman, J., Gygi, S. P., Kung, A. L., Look, T., Nakayama, K. I., DePinho, R. A., and Wei, W. (2011) SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* **471**, 104-109
30. Magiera, M. M., Mora, S., Mojsa, B., Robbins, I., Lassot, I., and Desagher, S. (2013) Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons. *Cell Death Differ* **20**, 281-292
31. Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773-786
32. Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., Yue, P., Dornan, D., Huang, D. C., and Dixit, V. M. (2010) Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* **463**, 103-107
33. Perez-Mancera, P. A., Rust, A. G., van der Weyden, L., Kristiansen, G., Li, A., Sarver, A. L., Silverstein, K. A., Grutzmann, R., Aust, D., Rummele, P., Knosel, T., Herd, C., Stemple, D. L., Kettleborough, R., Brosnan, J. A., Li, A., Morgan, R., Knight, S., Yu, J., Stegeman,

- S., Collier, L. S., ten Hoeve, J. J., de Ridder, J., Klein, A. P., Goggins, M., Hruban, R. H., Chang, D. K., Biankin, A. V., Grimmond, S. M., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Wessels, L. F., Wood, S. A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Pilarsky, C., Largaespada, D. A., Adams, D. J., and Tuveson, D. A. (2012) The deubiquitinase USP9X suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature* **486**, 266-270
34. Ticchioni, M., Essafi, M., Jeandel, P. Y., Davi, F., Cassuto, J. P., Deckert, M., and Bernard, A. (2007) Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* **26**, 7081-7091
35. Ovaa, H., Galardy, P. J., and Ploegh, H. L. (2005) Mechanism-based proteomics tools based on ubiquitin and ubiquitin-like proteins: synthesis of active site-directed probes. *Methods Enzymol* **399**, 468-478
36. Hu, M., Li, P., Song, L., Jeffrey, P. D., Chenova, T. A., Wilkinson, K. D., Cohen, R. E., and Shi, Y. (2005) Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* **24**, 3747-3756
37. Honigberg, L. A., Smith, A. M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D. H., Miller, R. A., and Buggy, J. J. (2010) The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13075-13080
38. D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M. H., Fryknas, M., Lindsten, K., De Cesare, M., Perego, P., Sadeghi, B., Hassan, M., Larsson, R., and Linder, S. (2011) Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med* **17**, 1636-1640
39. Peth, A., Besche, H. C., and Goldberg, A. L. (2009) Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol Cell* **36**, 794-804
40. Gores, G. J., and Kaufmann, S. H. (2012) Selectively targeting Mcl-1 for the treatment of acute myelogenous leukemia and solid tumors. *Genes Dev* **26**, 305-311
41. Pal, A., Young, M. A., and Donato, N. J. (2014) Emerging Potential of Therapeutic Targeting of Ubiquitin-Specific Proteases in the Treatment of Cancer. *Cancer Res* **74**, 4955-4966
42. Colland, F., Formstecher, E., Jacq, X., Reverdy, C., Planquette, C., Conrath, S., Trouplin, V., Bianchi, J., Aushev, V. N., Camonis, J., Calabrese, A., Borg-Capra, C., Sippl, W., Collura, V., Boissy, G., Rain, J. C., Guedat, P., Delansorne, R., and Daviet, L. (2009) Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther* **8**, 2286-2295
43. Kapuria, V., Peterson, L. F., Fang, D., Bornmann, W. G., Talpaz, M., and Donato, N. J. (2010) Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res* **70**, 9265-9276
44. Burger, J. A. (2011) Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**, 96-103
45. Lam, Y. A., Xu, W., DeMartino, G. N., and Cohen, R. E. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* **385**, 737-740
46. Hanna, J., Hathaway, N. A., Tone, Y., Crosas, B., Elsasser, S., Kirkpatrick, D. S., Leggett, D. S., Gygi, S. P., King, R. W., and Finley, D. (2006) Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* **127**, 99-111
47. Tian, Z., D'Arcy, P., Wang, X., Ray, A., Tai, Y. T., Hu, Y., Carrasco, R. D., Richardson, P., Linder, S., Chauhan, D., and Anderson, K. C. (2014) A novel small molecule inhibitor of

- deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood* **123**, 706-716
48. Lee, B. H., Lee, M. J., Park, S., Oh, D. C., Elsasser, S., Chen, P. C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S. P., Wilson, S. M., King, R. W., and Finley, D. (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* **467**, 179-184
 49. Mines, M. A., Goodwin, J. S., Limbird, L. E., Cui, F. F., and Fan, G. H. (2009) Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK activation. *J Biol Chem* **284**, 5742-5752
 50. Mialki, R. K., Zhao, J., Wei, J., Mallampalli, D. F., and Zhao, Y. (2013) Overexpression of USP14 protease reduces I-kappaB protein levels and increases cytokine release in lung epithelial cells. *J Biol Chem* **288**, 15437-15441
 51. Jung, H., Kim, B. G., Han, W. H., Lee, J. H., Cho, J. Y., Park, W. S., Maurice, M. M., Han, J. K., Lee, M. J., Finley, D., and Jho, E. H. (2013) Deubiquitination of Dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. *Oncogenesis* **2**, e64
 52. Wu, N., Liu, C., Bai, C., Han, Y. P., Cho, W. C., and Li, Q. (2013) Over-Expression of Deubiquitinating Enzyme USP14 in Lung Adenocarcinoma Promotes Proliferation through the Accumulation of beta-Catenin. *International journal of molecular sciences* **14**, 10749-10760
 53. Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B. E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K. A., Porter, J. A., Lu, C. X., and ten Dijke, P. (2012) USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF-beta type I receptor. *Nat Cell Biol* **14**, 717-726

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 : Inhibition of DUBs activity induces cell death in hematological malignancies

A) Five CLL patients were treated for 24h with increasing doses of WP1130. Viability was observed with Annexin-V/7-AAD negative cells on FACS. Ramos, MEC1, DOHH2 and RL cell lines were treated for 24 h with increasing doses of WP1130 (B) or HBX41108 (C). Cell metabolism was assessed using MTS test. D) Ramos, MEC1, DOHH2, RL and CLL cells were treated 6h with BAY61-3606 or WP1130. Lysates were incubated with Ubiquitin-AMC. DUB activity was measured by monitoring substrate cleavage. (*p<0.05)

FIGURE 2 : BCR stimulation enhances DUB activity

A) Ramos cells were treated during 30 min with anti-IgM. Lysates were incubated with Ubiquitin-AMC. DUB activity was measured by monitoring substrate cleavage. B) Ramos cells were treated during different times with anti-IgM. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for HA, MCL-1 and HSP90 as a loading control. C) Same as B) but lysates were blotted for USP14 and HSP90 as a loading control.

FIGURE 3 : Pharmacological inhibition of BCR signaling abrogates USP14 activity

A) Ramos cells were treated during 6h with Ibrutinib, BAY61-3606, WP1130 and 30 min with anti-IgM. Lysates were incubated with Ubiquitin-AMC. DUB activity was measured by monitoring substrate cleavage. B) Same as A) but lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for HA, USP14, MCL-1 and HSP90 as a loading control. C) Ramos cells were treated during 6h with BAY61-3606, WP1130 and IU1. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C. Lysates were immunoprecipitated with anti-USP14 and blotted for HA and USP14. (*p<0.005)

FIGURE 4 : Pharmacological inhibition of USP14 activity decreases MCL-1 expression and survival of B cell neoplasms

A) Ramos cells were treated during 6h with increasing doses of IU1. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for USP14, MCL-1 and HSP90 as a loading control. B)

Ramos and MEC1 cell lines were treated during 24h with increasing doses of IU1. Cell metabolism was assessed using TMS test. C) Three CLL patients were treated for 24h with increasing dose of IU1. Viability was assessed using Annexin-V/7-AAD staining. (*p<0.05)

FIGURE 5 : siRNA-mediated knockdown of USP14 reduces MCL-1 expression and malignant B cell survival

A) Ramos were transfected with luciferase siRNA (siCtrl), USP14 siRNA or MCL-1 siRNA. Lysates were blotted for USP14, MCL-1, BCL-2 and HSP90 as a loading control. Viability was assessed using Annexin-V/7-AAD staining. B) CLL patient was transfected with luciferase siRNA (siCtrl) or USP14 siRNA. Lysates were blotted for USP14, MCL-1 and HSP90 as a loading control. The graph bar represents the quantification levels of USP14 and MCL-1, normalized on total HSP90 level. C) Three CLL patients were transfected with luciferase siRNA (siCtrl) or USP14 siRNA. Viability was assessed using Annexin-V/7-AAD staining. (*p<0.05)

FIGURE 6 : SYK activates USP14 in B cell lymphoma

A) Ramos cells are treated 6h with BAY61-3606 and WP1130. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for HA, USP14, MCL-1, BCL-2 and HSP90 as a loading control. B) Ramos patients were treated 6h with BAY61-3606 or WP1130 and USP14 mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. C) Ramos were transfected with Luciferase siRNA (siCtrl), siUSP14 and siSYK. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for SYK, USP14, MCL-1, BCL-2 and ERK2 as a loading control. D) Ramos cells were treated for 2h with BAY61-3606 and 30 min with anti-IgM. Nuclei, USP14 and SYK were respectively stained with DAPI, USP14 and SYK antibodies. Cells were then analyzed under a fluorescence microscope. E) Ramos cells are transfected with Luciferase siRNA (siCtrl), siUSP14 and siSYK. Cells were treated during 30 min anti-IgM. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for USP14, SYK, MCL-1 and HSP90 as a loading control.

FIGURE 7 : AKT regulates USP14 activity and MCL-1 levels in B cell lymphoma

A) In Up panel, Ramos cells are treated 6h with BAY61-3606 and MKK2206. Lysates were incubated with Ubiquitin-AMC. DUB activity was measured by monitoring substrate cleavage. In Down panel, Ramos cells were treated during 24h with BAY61-3606 and MKK2206. Cell

metabolism was assessed using TMS test. **B)** Ramos cells were treated during 6h with MK2206 and 30 min with anti-IgM. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for USP14, P-AKT, P-PRAS, P-GSK3 α/β , MCL-1 and HSP90 as loading control. **C)** Ramos cells were transfected with Luciferase siRNA (siCtrl), and siAKT1/2. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for USP14, Pan-AKT, MCL-1 and HSP90 as a loading control. Viability was assessed using Annexin-V/7-AAD staining. (*p<0.05)

FIGURE 8 : USP14, MCL-1 and proteasome are co-localized under BCR stimulation

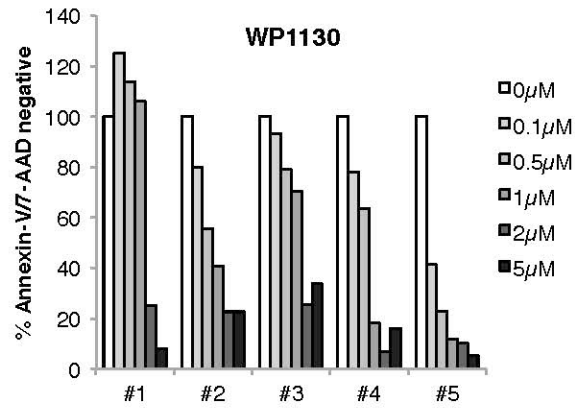
A) Ramos cells are treated for 2h with Ibrutinib, BAY61-3606, MG132 and 30 min with anti-IgM. Lysates are incubated with Suc-LLVY-AMC. DUB activity was measured by monitoring substrate cleavage. **B)** Ramos cells were treated for 2h with Ibrutinib, BAY61-3606 and 30 min with anti-IgM. Nuclei, USP14 and MCL-1 were respectively stained with DAPI, USP14 antibody and MCL-1 antibody. **C)** Ramos cells were treated for 2h with Ibrutinib, BAY61-3606 and 30 min with anti-IgM. Nuclei, USP14 and proteasome were respectively stained with DAPI, USP14 antibody and proteasome 19S S7 antibody. Cells were then analyzed under a fluorescence microscope. (*p<0.05)

FIGURE 9: CLL co-culture with stromal cells enhances USP14 activity

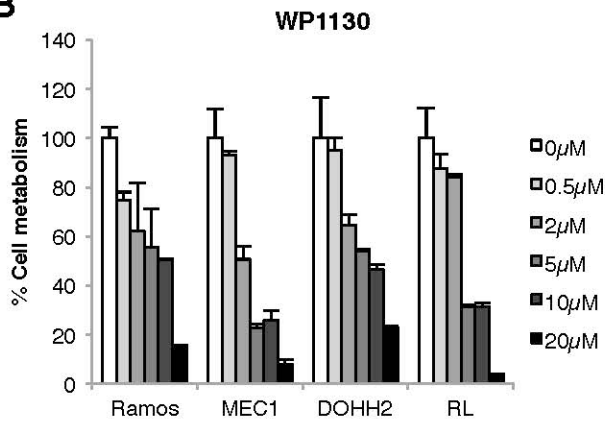
A) Left panel. Cells from 3 CLL patients were co-cultured with HS-5 stromal cells during 48h. Lysates were incubated with Ubiquitin-AMC. DUB activity was measured by monitoring substrate cleavage. Right panel. Cells from 6 patients were co-cultured with HS-5 stromal cells during 48h. Viability was assessed using Annexin-V/7-AAD staining. **B)** CLL cells were co-cultured with HS-5 stromal cells during 48h. Lysates were incubated 30 min with HAUb-VS probe at 37°C and blotted for HA, USP14, MCL-1 and HSP90 as a loading control. (*p<0.05)

FIGURE 1

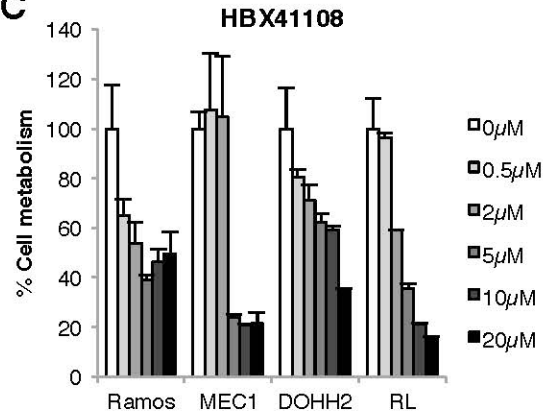
A



B



C



D

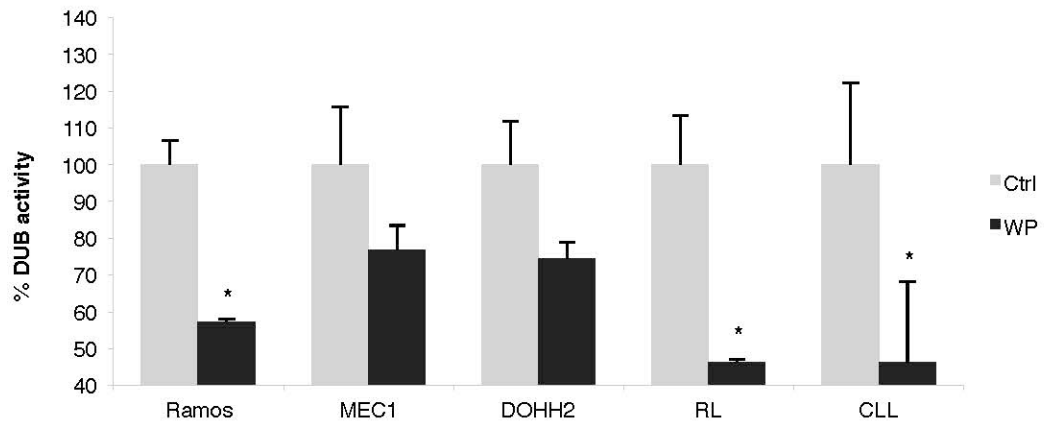


FIGURE 2

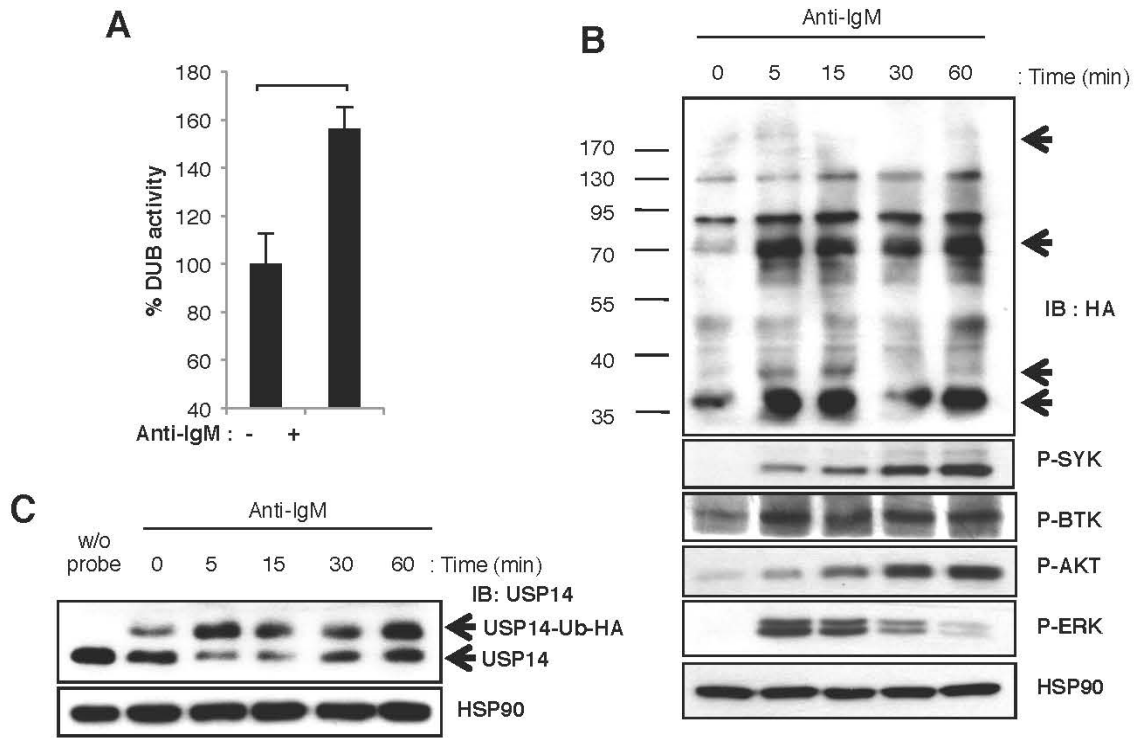


FIGURE 3

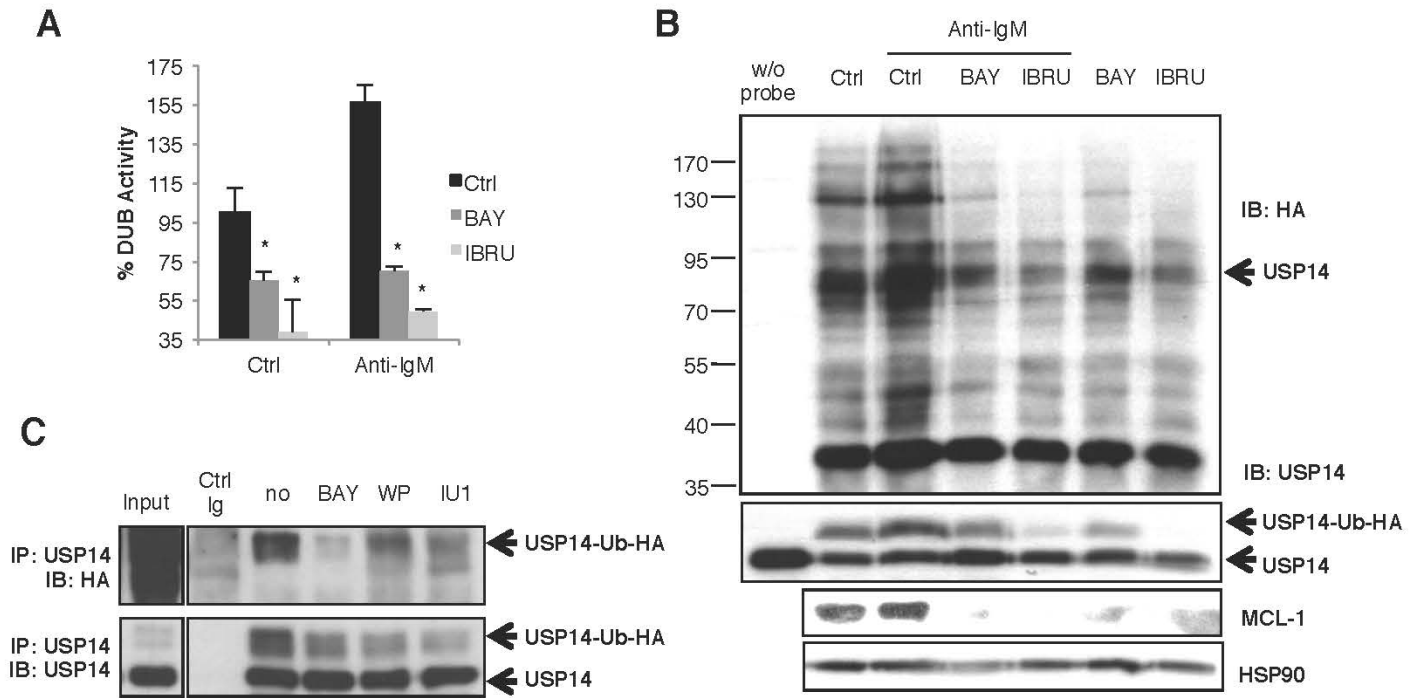
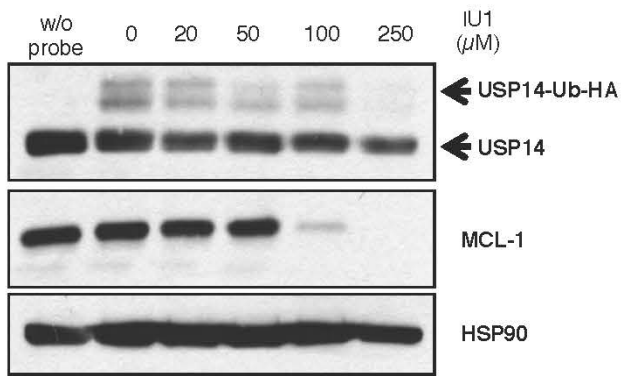
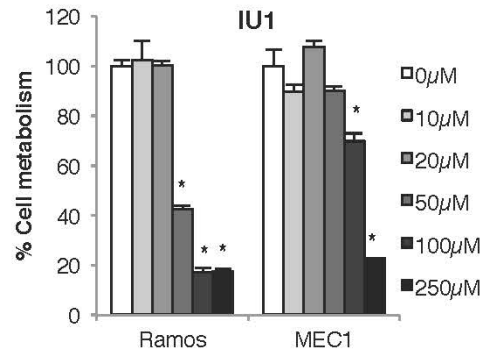


FIGURE 4

A



B



C

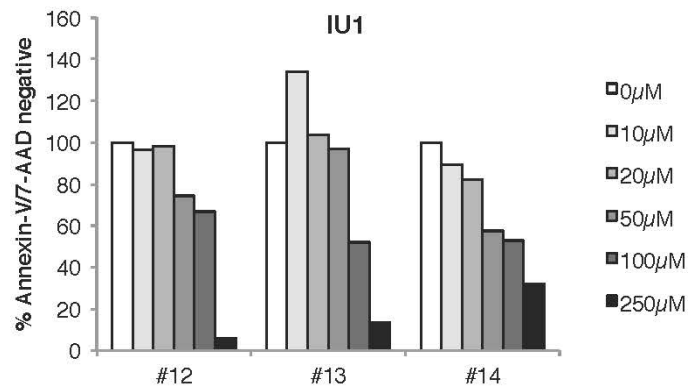
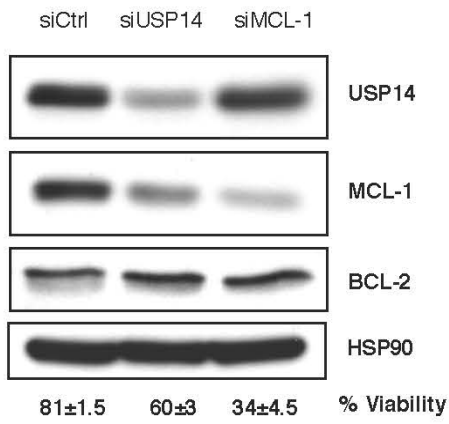
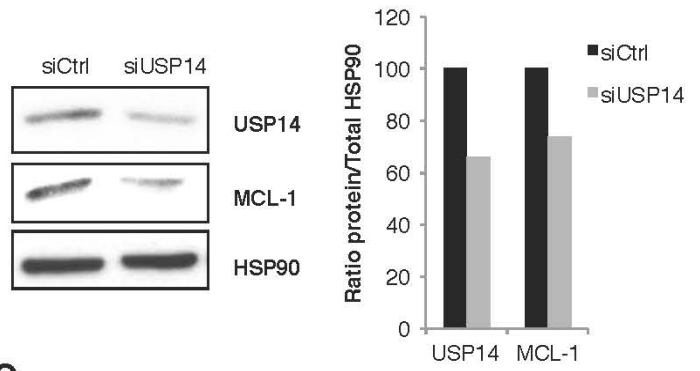


FIGURE 5

A



B



C

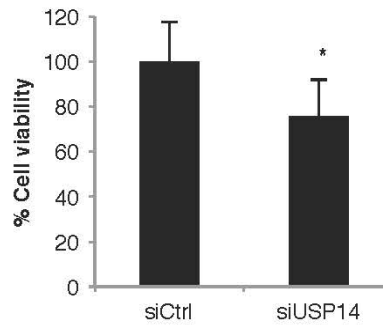


FIGURE 6

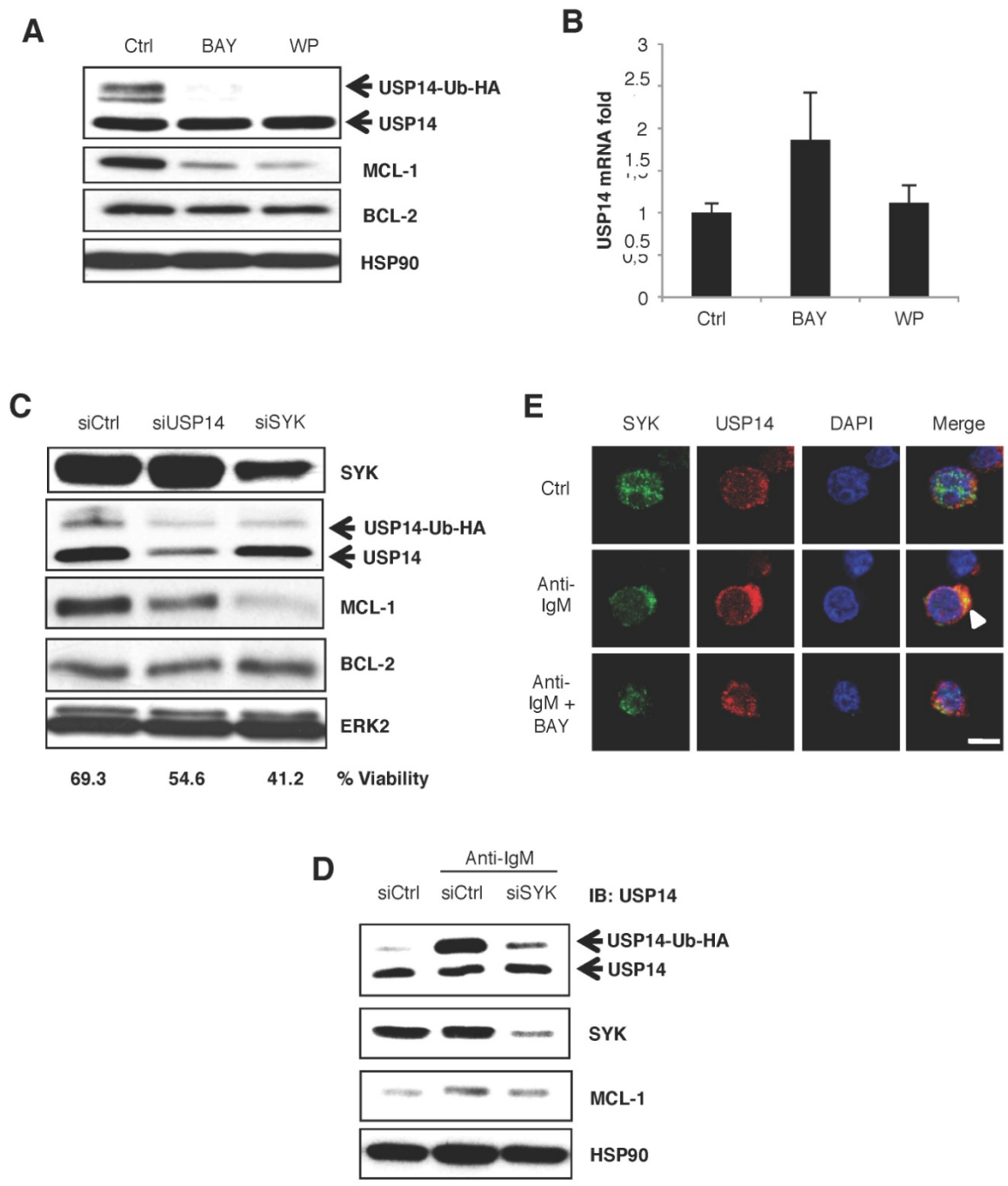


FIGURE 7

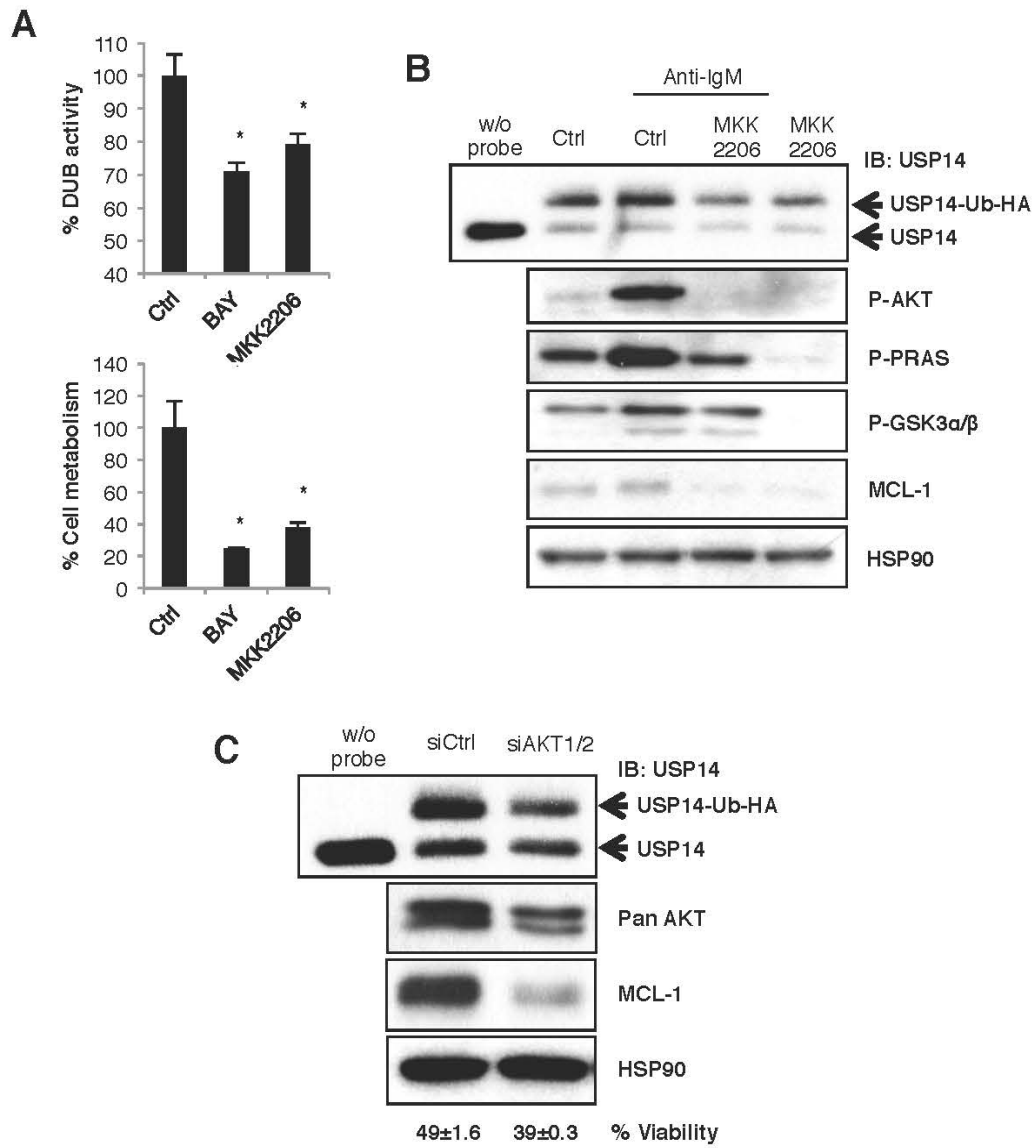


FIGURE 8

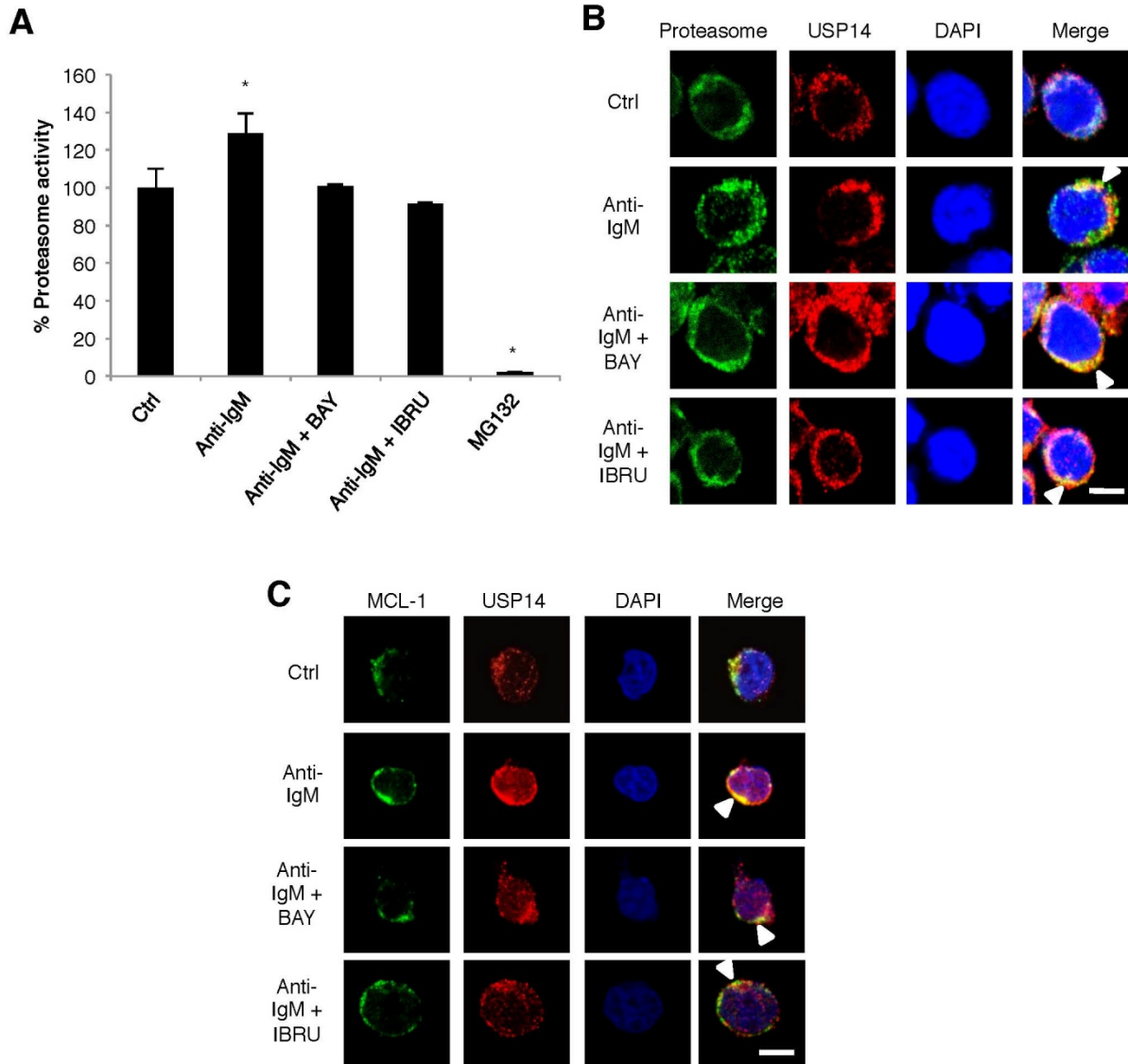
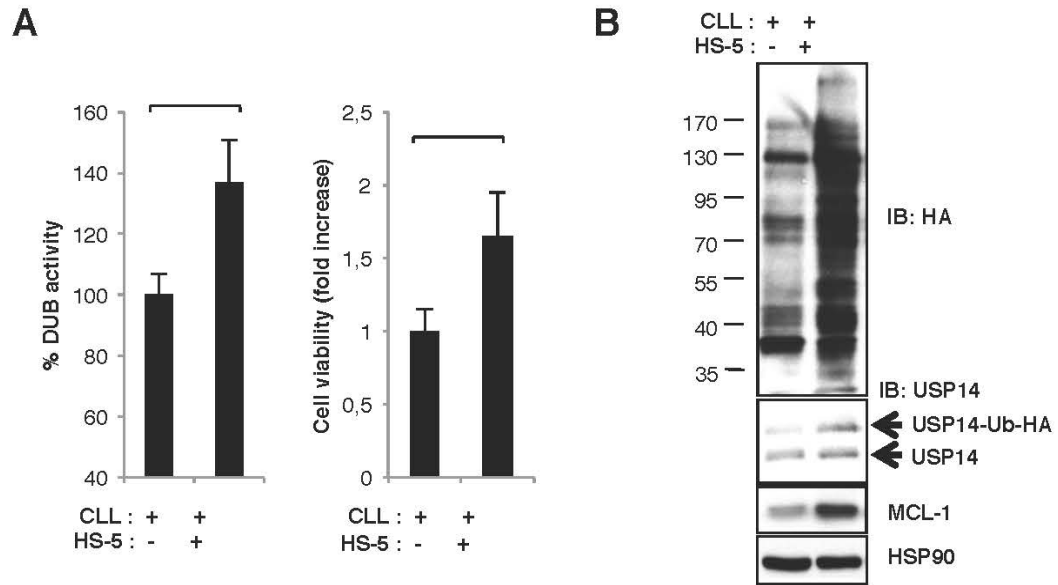
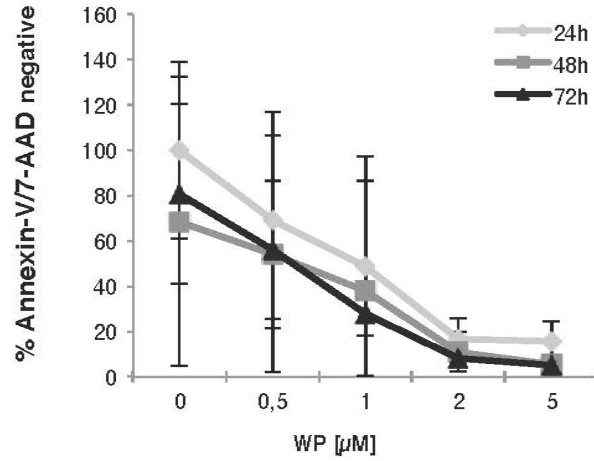


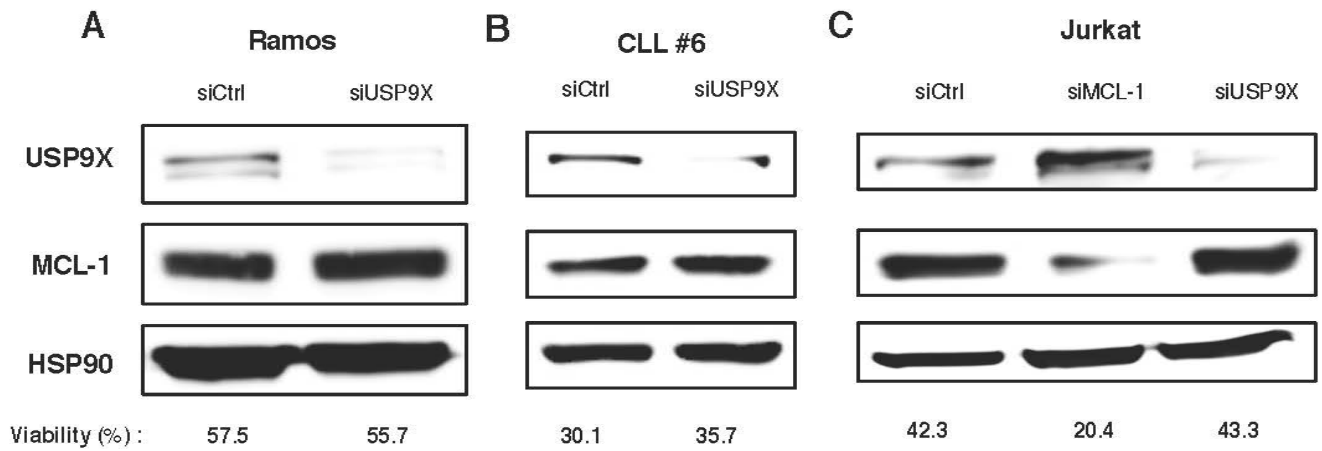
FIGURE 9



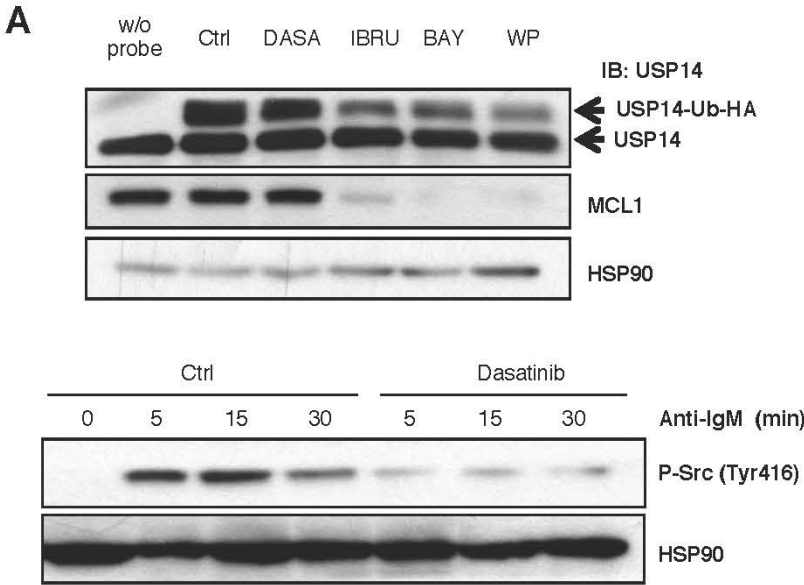
Supplementary FIGURE S1



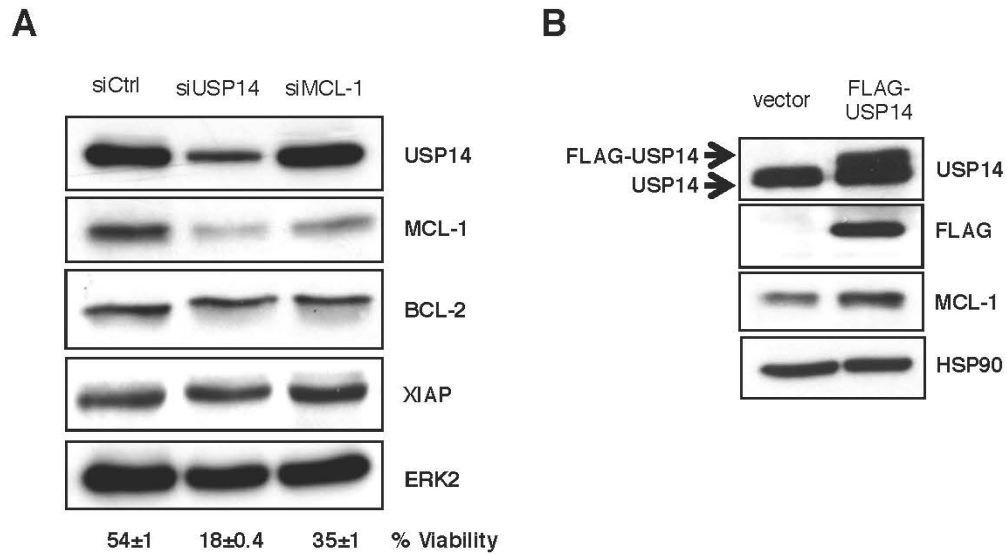
Supplementary FIGURE S2



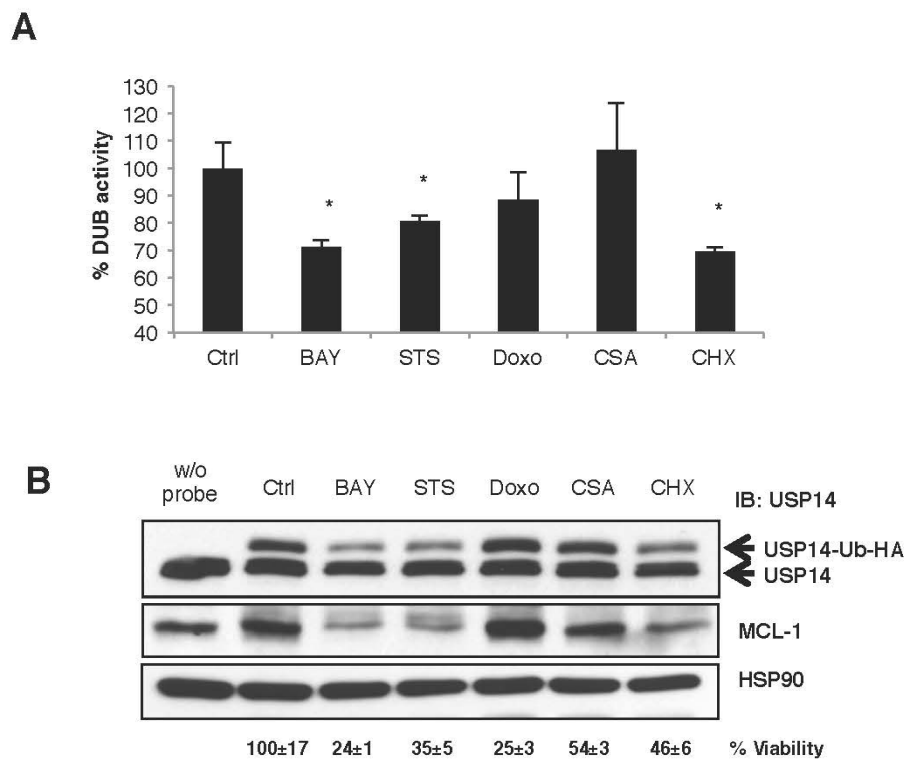
Supplementary FIGURE S3



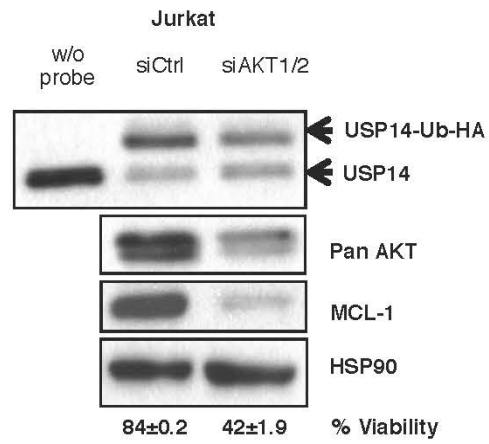
Supplementary FIGURE S4



Supplementary FIGURE S5



Supplementary FIGURE S6



Discussion

Les modifications post-traductionnelles dues aux protéines d'ubiquitine et aux protéines ubiquitin-like jouent un rôle majeur dans le devenir et les fonctions de nombreuses protéines cellulaires (Hershko and Ciechanover, 1998; Komander, 2009). Plusieurs des enzymes clés impliquées dans ces mécanismes voient leur activité amplifiée ou modifiée dans de nombreuses pathologies. Le rôle spécialisé dans le cycle de l'ubiquitine des enzymes de déubiquitination (DUBs) émerge dans le contrôle de la plupart des voies de signalisation et l'expression d'oncoprotéines. A ce titre le ciblage des DUBs dans le cancer s'avère être une stratégie pertinente dans l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées (Hussain et al., 2009). Dans cette étude, nous montrons l'importance de l'activité DUB dans les lymphomes non hodgkiniens (LNH) à cellules B matures et, pour la première fois, le rôle du récepteur aux cellules B (BCR) et des signaux protecteurs du microenvironnement, dans l'activation de nombreuses DUBs et plus spécifiquement de USP14. De plus, nous montrons le rôle clé de USP14 dans la régulation de la protéine anti-apoptotique MCL-1 et la survie des cellules B malignes.

Les LNH à cellules B matures constituent un groupe hétérogène de plus de 30 pathologies distinctes. La plupart de ces lymphomes (environ 85-90%) sont originaires des lymphocytes B (Institut de veille sanitaire, 2013). Ces pathologies proviennent d'un précurseur B normal dont le développement au cours de la sélection dans les centres germinatifs ou le développement post-germinatif va dériver vers une cellule cancéreuse. Le pronostic global est très variable selon les différentes formes histologiques. Ces formes peuvent être classées selon des progressions indolentes ou agressives. Mais ces dernières années, la stimulation du BCR et les voies de signalisation qui en découlent ont été mises en avant comme faisant partie des événements oncogéniques majeurs communs aux différents LNH (Young and Staudt, 2013). Parmi les LNH, la LLC constitue la forme de leucémie la plus fréquente chez l'adulte. Une caractéristique majeure des cellules de LLC est leur résistance accrue à l'apoptose physiologique. Cette résistance est le résultat d'une combinaison de facteurs intrinsèques et de facteurs extrinsèques à la cellule, liés au microenvironnement des cellules leucémiques. Parmi ces facteurs, la signalisation issue du BCR s'est avérée avoir un rôle clé dans la LLC, et plus largement dans les LNH à cellules B matures, se traduisant, notamment par le développement de nouvelles thérapies ciblant cette signalisation (Young and Staudt, 2013).

Ces dernières années l'inhibition spécifique des DUB s'est révélée être une stratégie valable dans la thérapie anticancéreuse. L'utilisation du WP1130, un inhibiteur général des DUBs ou du HBX41108, un inhibiteur spécifique d'USP7/HAUSP, mais se révélant être un inhibiteur de DUB non sélectif, ont montré d'excellents résultats dans l'induction de la mort cellulaire essentiellement par des mécanismes d'apoptose (Colland et al., 2009; Kapuria et al., 2010; Pal et al., 2014). Utilisés sur des cellules de LLC et diverses lignées de LNH, ces inhibiteurs montrent un effet anticancéreux (Figure 1) similaire à ce qui a déjà été décrit pour d'autres cancers. Cet effet anticancéreux s'avère être accompagné d'une inhibition générale des DUBs (Figure 1D), démontrant l'importance du rôle de ces enzymes dans les hémopathies malignes.

Dans le cas des LNH à cellules B matures, le rôle majeur du microenvironnement et de la signalisation du BCR sur la survie des cellules tumorales est un fait bien établi et doit désormais être pris en compte dans l'élaboration de nouvelles thérapies (Burger, 2011; Coupland, 2011; Shain and Tao, 2014; ten Hacken and Burger, 2014). De plus, il est maintenant reconnu que le microenvironnement joue un rôle essentiel pour le développement de résistance des cellules cancéreuses aux thérapies actuelles (Meads et al., 2009). Ainsi, nous nous sommes posés la question du rôle des DUBs d'une part dans la voie de signalisation du BCR et d'autre part dans un système simulant le rôle protecteur du microenvironnement sur la survie des cellules B malignes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les cellules B stimulées par le BCR présentent une activation rapide de l'activité générale des DUBs, en parallèle de l'activation de SYK, BTK et de protéines plus en aval tel que ERK et AKT (Figure 2). De plus, des cellules de LLC co-cultivées avec des cellules fibroblastiques de la moelle osseuse montrent une survie largement augmentée, s'accompagnant d'une surexpression de la protéine anti-apoptotique MCL-1 et d'une augmentation de l'activité générale des DUBs (Figure 9). L'utilisation d'une sonde piège constituée d'ubiquitine étiquetée HA associée à un groupement actif vinyl-sulfone (Borodovsky et al., 2002), nous a permis d'établir des profils de DUBs actives dans les cellules stimulées par le BCR et le microenvironnement stromal et d'identifier certaines DUBs parmi les plus actives dans les cellules B malignes. Parmi celles-ci, nous avons mis en évidence une augmentation importante de l'activité de l'enzyme de déubiquitination USP14 (Figure 2 et Figure 9).

USP14 est une protéase à cystéine de la famille des protéases spécifiques de l'ubiquitine ou « Ubiquitin-Specific Proteases » (USP). Elle a été identifiée comme l'une des DUBs associées au protéasome. USP14 est liée à la sous-unité Rpn11 du protéasome 19S (Leggett et al., 2002). Sa présence au protéasome n'est pas essentielle et l'inhibition de son activité n'inhibe pas complètement le fonctionnement du protéasome. En effet, il a été démontré qu'USP14 régule l'activité de l'ouverture de la porte du protéasome 20S par sa liaison au protéasome et non par son activité d'enzyme de déubiquitination (Peth et al., 2009). Toutefois, sa capacité à déubiquitiner les protéines joue également un rôle important dans le fonctionnement de la dégradation des protéines au protéasome. USP14 de même que la DUB UCHL5 ont été décrites comme ayant une fonction de contrôle qualité de la dégradation des protéines au protéasome. Ces deux enzymes sont capables de cliver les chaînes d'ubiquitine des protéines afin de ne laisser plus que deux molécules d'ubiquitine. Ces chaînes courtes ne sont pas reconnues par le protéasome et ainsi les protéines présentant des chaînes courtes non-dégradables vont être libérées et non dégradées. L'activité de USP14 et UCHL5 permet une régulation dynamique du fonctionnement du protéasome par l'inhibition de la dégradation de ses substrats (Hanna et al., 2006; Lam et al., 1997). Mais au-delà de son rôle dans le contrôle qualité des protéines menées au protéasome et du recyclage des chaînes d'ubiquitine, plusieurs cibles spécifiques de USP14 ont déjà été identifiées. Ainsi USP14 est capable de déubiquitiner le récepteur aux chimiokines CXCR4 pour éviter sa dégradation. USP14 en stabilisant cette protéine joue un rôle dans la migration cellulaire (Mines et al., 2009). USP14 permettrait également la stabilisation de la β -caténine dans le cancer du poumon et favoriserait ainsi le développement de ces cancers (Wu et al., 2013). Enfin, USP14 a été décrite comme capable de réguler des voies de signalisation importantes dans les processus cancéreux. En effet, USP14 déubiquitine I- κ B, une protéine inhibitrice de la voie NF- κ B et régule ainsi cette voie (Mialki et al., 2013) ;

de même qu'il déubiquitine Dishevelled, une protéine régulatrice de la voie Wnt, favorisant son activation (Jung et al., 2013).

Au cours des dernières années, des inhibiteurs de USP14 ont été développés pour le traitement anticancéreux. Parmi ceux-ci, une petite molécule inhibitrice IU1 est capable d'inhiber spécifiquement USP14 et ainsi d'altérer la dégradation de nombreux substrats par le protéasome (Lee et al., 2010). IU1 nécessite de forte concentration afin d'inhiber l'activité de USP14 allant jusqu'à 100 μ M pour une inhibition totale. Utilisé à des doses similaires dans notre étude, le IU1 démontre en plus de l'inhibition de l'activité de USP14, un effet cytotoxique dans les lymphomes de type B et les cellules de LLC. Cet effet cytotoxique s'accompagne d'un effet rapide et drastique sur l'effondrement des niveaux de MCL-1 (Figure 4). Dans leur étude, Lee et al. ne démontrait aucun pouvoir cytotoxique du seul IU1. Il était nécessaire d'inhiber d'autres mécanismes du protéasome pour que l'inhibition de USP14 s'accompagne d'un effet cytotoxique. C'est ce qui a été observé avec l'utilisation du b-AP15 qui inhibe non seulement l'activité de USP14 mais également celle d'UCHL5 (D'Arcy et al., 2011). De plus la présence d'UBP6, l'orthologue de USP14 dans les levures s'avère être non essentielle à la survie (Guterman and Glickman, 2004; Leggett et al., 2002). Le rôle de USP14 dans les voies de survie cellulaire restait donc à éclaircir. Ne pouvant exclure un effet non spécifique de l'inhibiteur pharmacologique de USP14, nous avons choisi d'éteindre spécifiquement USP14 par interférence à ARN afin de confirmer nos résultats. Nous avons pu mettre en évidence que l'extinction de USP14 est suffisante pour entraîner une mort cellulaire et que la diminution d'expression de USP14 est corrélée à la diminution des niveaux de MCL-1, car elle n'altère pas les niveaux d'autres molécules pro-survie tel que BCL-2 (Figure 5 et 6c). A l'inverse, la surexpression de USP14 dans des cellules leucémiques T, cellules dans lesquelles nous avons observé des résultats similaires pour l'extinction de USP14, s'accompagne d'une augmentation des niveaux de MCL-1 (Figure supplémentaire 4).

MCL-1 est essentielle pour la survie de multiples types cellulaires et sa surexpression contribue à la tumorigénèse. MCL-1 possède une demi-vie très courte (environ 17 minutes) et sa régulation est finement orchestrée par de nombreux mécanismes dynamiques. En effet, MCL-1 est régulée au niveau transcriptionnel et traductionnel. Ainsi, le promoteur de MCL-1 est activé par les voies de signalisation des MAP kinases, PI3K/AKT et JAK/STAT et est directement inhibé par E2F1 (Croxtton et al., 2002). MCL-1 est sujet à un épissage alternatif qui va permettre de produire des formes courtes de la protéine aux fonctions réduites (Bingle et al., 2000; Kim and Bae, 2013). MCL-1 est également régulée par plusieurs microARNs, le plus connu étant le miR29 qui se lie directement à la région 3'UTR du messenger de MCL-1 (Mott et al., 2007). Différents mécanismes altèrent également l'expression de MCL-1 tels la restriction calorique qui va diminuer les niveaux d'ARN messenger de MCL-1 (Meynet et al., 2013; Thomas et al., 2010). MCL-1 est également connue pour ses nombreuses modifications post-traductionnelles. MCL-1 peut-être clivée (Clohessy et al., 2004) et phosphorylée par différentes voie de signalisations conduisant à la stabilisation ou à la dégradation de la protéine (Gandhi et al., 2008). Par exemple, sa phosphorylation en Ser64 par les CDK1, CDK2 et JNK vont augmenter l'affinité de MCL-1 pour les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (Kobayashi et al., 2007). Sa phosphorylation en Thr92 et Thr163 induite par ERK vont, quant à elles, stabiliser MCL-1 dans les cancers (Domina et al., 2004; Nifoussi et al., 2012). Enfin les phosphorylations en Ser155 et Ser159 de MCL-1 par GSK3- β sont

dégradatives et vont conduire à sa destruction par le protéasome (Maurer et al., 2006). Dans certains cancers, JNK s'est révélée capable de phosphoryler MCL-1 en Thr163. Cette phosphorylation s'avère nécessaire pour permettre les phosphorylations par GSK3- β (Thomas et al., 2010).

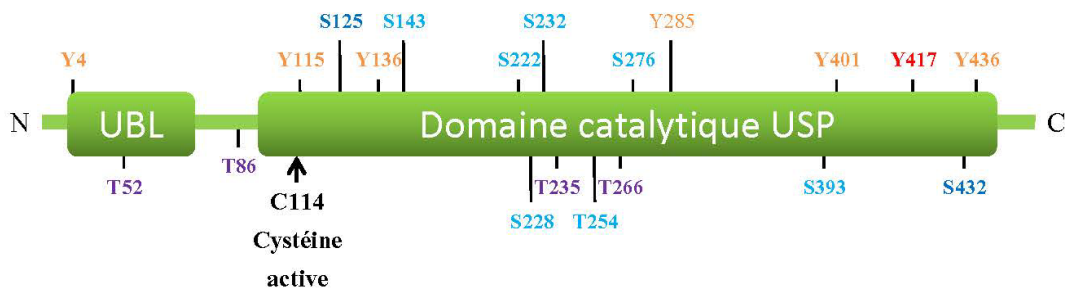
Dernièrement ont été mis en avant les mécanismes d'ubiquitination et déubiquitination de MCL-1 dans sa régulation par le système ubiquitine protéasome (Mojsa et al., 2014). Ces dernières années plusieurs E3 ligases ont été identifiées comme capable d'ubiquitiner MCL-1. Parmi celles-ci, on dénombre Mule/HUWE1/ARF-BP1 (Zhong et al., 2005) et APC/C^{Cdc20} (Harley et al., 2010), ainsi que SCF ^{β -TrCP} (Ding et al., 2007), Trim17 (Magiera et al., 2013) et SCF^{Fbw7} (Inuzuka et al., 2011) dont l'action est favorisée par la phosphorylation de MCL-1 par GSK3- β . Parmi les E3 ligases, le rôle de SCF^{Fbw7} sur MCL-1 s'avère des plus importants. Cette E3 ligase a un rôle clé dans les processus tumoraux et la promotion des LNH car elle s'est révélée capable d'ubiquitiner d'autres protéines oncogéniques majeures telles que c-Myc, la cycline E, Notch et c-Jun. Si les mécanismes d'ubiquitination et les enzymes associées à MCL-1 commencent à être connus, il n'en est pas de même pour ses enzymes de déubiquitination. Ku70, une protéine impliquée dans la réparation des dommages au double brin d'ADN posséderait une activité de déubiquitination et s'est montrée capable de déubiquitiner MCL-1 (Wang et al., 2014a). Une autre DUB décrite comme capable de déubiquitiner MCL-1 est USP9X (Schwickart et al., 2010). Toutefois son rôle sur MCL-1 semble être dépendant du contexte cellulaire car cette DUB ne montre aucun effet sur la régulation de MCL-1 dans des adénocarcinomes pancréatiques (Perez-Mancera et al., 2012) et un impact faible dans les cellules leucémiques T (Trivigno et al., 2012). Nos propres observations ne montrent d'ailleurs aucun effet de la suppression de USP9X sur les niveaux de MCL-1 dans plusieurs lignées cellulaires parmi lesquelles des cellules primaires de LLC et la lignée de lymphome de Burkitt, Ramos (Figure supplémentaire 3).

Nos résultats suggèrent USP14 comme une nouvelle enzyme de déubiquitination de MCL-1. Cette hypothèse étayée par nos observations montrant une co-localisation de USP14 et MCL-1 dans la cellule B maligne (Figure 8c). Ce phénomène est encore plus marqué lors d'une stimulation par des anticorps anti-IgM qui conduisent au « capping » du BCR. Ce phénomène - artificiellement déclenché *in vitro* par des anticorps anti-IgM - traduit la stimulation « physiologique » du BCR qui se produit lors de sa liaison avec l'antigène (Graziadei et al., 1990; Imamura et al., 2009). Le « capping » du BCR permet la phosphorylation par la kinase LYN des motifs ITAMs présents dans la partie cytoplasmique des sous-unités signalisatrices du BCR, le recrutement et l'activation de SYK et de BTK et la formation de complexes multimoléculaires de signalisation impliquées dans l'activation des cellules B malignes. Nous constatons que MCL-1, USP14 et le protéasome font partis de ce phénomène en se retrouvant co-localisés plus fortement lors d'une stimulation du BCR au niveau du « capping » (Figure 8c). USP14 existe sous forme libre dans la cellule, en ce cas elle est inactive. C'est lorsque USP14 va se lier au protéasome qu'elle va être activée (Hu et al., 2005). Dans ce contexte, nous avons observé que la stimulation du BCR augmente l'activité de USP14, alors que, l'inhibition SYK et de BTK réduit fortement son activité. Nos observations suggèrent donc que USP14 est régulée par la voie de signalisation du BCR, pour favoriser sa liaison au protéasome et déclencher son activité de déubiquitination (Figure 8b et Figure 6).

Une fois activée au protéasome, on peut faire l'hypothèse qu'USP14 va exercer sa fonction de contrôle qualité des protéines amenées pour dégradation, notamment sur MCL-1 qui va se voir protéger

de la dégradation par le système ubiquitine-protéasome. A l'inverse, lorsqu'USP14 est inactive, MCL-1 dont le renouvellement protéique est très élevé, va se retrouver ubiquitinée par une ou plusieurs E3 ligases et dégradée au protéasome sans qu'USP14 n'ait exercé sa fonction protectrice.

Cette régulation de USP14 et du protéasome par le BCR est une observation originale qui a des implications pour notre compréhension de la signalisation du BCR, mais également pour la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant l'activité des enzymes de déubiquitination. En effet, si de plus en plus de DUBs et leurs cibles sont identifiées, presque rien n'est connu sur la régulation de l'activité des enzymes de déubiquitination. Notre étude montre que le BCR est capable de réguler l'activité de plusieurs enzymes de déubiquitination et celle de USP14. L'inhibition de SYK régule l'activité de USP14 sans altérer ses niveaux transcriptionnels ou protéiques. Ces observations ont été confirmées à l'aide d'une approche par interférence à ARN en éteignant la protéine SYK. L'extinction de SYK confirme la capacité de SYK à réguler l'activité de USP14. De plus SYK et USP14 sont co-localisées dans le « capping » engendré par la stimulation du BCR (Figure 6). Fait notable, USP14 présente un site Hem-ITAM dans sa séquence. La phosphorylation des sites ITAMs et Hem-ITAMs présents sur les immunorécepteurs permet le recrutement des protéines de la famille SYK par leurs domaines SH2 (Bezradica and Medzhitov, 2012). Cette observation permettrait de faire l'hypothèse d'une interaction directe de USP14 avec SYK, permettant à la fois son activation et le recrutement du protéasome dans le complexe BCR activé. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas pu mettre en évidence une phosphorylation sur tyrosine de USP14 (données non montrées) (Figure24), suggérant l'existence d'autres mécanismes impliqués dans l'activation de USP14 par le BCR.



USP14 (494 aa)

Figure 24: Site de phosphorylation putatif d'USP14. Site de phosphorylation putatif sur tyrosine en orange. Tyrosine du site Hem-ITAM putatif en rouge. Site de phosphorylation putatif sur thréonine en violet. Site de phosphorylation putatif sur sérine en bleu clair. Site de phosphorylation AKT putatif sur sérine en bleu foncé.

A ce titre, nos observations montrant un rôle essentiel de AKT en amont de USP14 dans les cellules B malignes. La voie PI3K-AKT constitue l'un des carrefours moléculaires les plus importants dans

la cellule et a un rôle majeur dans les mécanismes d'activation « tonique » et « chronique actif » du BCR contrôlant la migration, la prolifération et la survie des cellules B néoplasiques (Young and Staudt, 2013). AKT est activée par sa liaison aux phosphoinositides membranaires produits par la PI3K, elle-même activée par une phosphorylation effectuée par SYK. AKT inhibe l'activité de GSK3- β , réduisant ainsi la phosphorylation de MCL-1 qui favorise son ubiquitination par les E3 ligases de MCL-1 (Baudot et al., 2009; Maurer et al., 2006; Mojsa et al., 2014; Thomas et al., 2010). Récemment, l'une des rares régulations décrites d'enzyme de déubiquitination par phosphorylation, a impliqué AKT. En effet, dans le cancer du sein, AKT est capable de phosphoryler USP4, une DUB pro-oncogénique impliquée dans la dégradation du récepteur de TGF β de type I. Cette phosphorylation délocalise USP4 du noyau à la membrane où elle va pouvoir déubiquitiner le TGF β R I et prévenir sa dégradation. Ce processus conduit à une surexpression du TGF β R I et une plus forte activité pro-tumorale (Zhang et al., 2011a). A l'aide d'outils de bioinformatique, nous avons constaté que la séquence de USP14 présente des sites de phosphorylation potentiels par AKT (données non montrées) (Figure 24). Dans les cellules B malignes, nous avons montré qu'un inhibiteur pharmacologique d'AKT inhibe l'activité de USP14. Ces données sont confirmées par le recours à l'interférence à ARN ciblant AKT1/2. L'inhibition d'AKT entraîne une diminution de l'activité de USP14, des niveaux de MCL-1 et de la survie cellulaire (Figure 7). De façon intéressante, les cellules de leucémie T Jurkat, qui ont pour caractéristique une activation constitutive d'AKT suite à la mutation du suppresseur de tumeur PTEN (Shan et al., 2000) et une mutation de la E3 ligase FBW7 (O'Neil et al., 2007), présentent des niveaux très importants de MCL-1 nécessaires à la survie des cellules leucémiques. Dans ce contexte également, la suppression par interférence à ARN d'AKT et de USP14 entraîne la chute des niveaux protéiques de MCL-1 et la mort cellulaire (Figure Supplémentaire S4 et S6). Ces observations suggèrent que la régulation de USP14 par la voie PI3K-AKT est un phénomène assez général et il serait intéressant d'étudier l'impact de l'inhibition de la PI3K sur l'activité de USP14 et du protéasome dans les LNH à cellules B matures. En effet, le ciblage de la PI3K par des petites molécules inhibitrices est en cours d'évaluation clinique avec d'excellents résultats sur la survie cellulaire (Badura et al., 2013; Macias-Perez and Flinn, 2013).

Mis ensemble nos résultats permettent d'établir un modèle dans lequel, pour la première fois, il est montré que le BCR et les signaux protecteurs du microenvironnement modulent l'activité de certaines DUBs, parmi lesquelles la DUB associée au protéasome USP14. Dans la signalisation du BCR, l'activité de USP14, dépendante de SYK, BTK et AKT, régule la survie cellulaire et les niveaux protéiques de la protéine anti-apoptotique MCL-1. Dans ce modèle, AKT devient le chef d'une balance permettant d'un côté de prévenir l'action destructrice des E3 ubiquitine ligases de MCL-1 et de l'autre côté de favoriser l'activation de la déubiquitinase USP14 qui va participer à la stabilisation de MCL-1 (Figure 25).

Notre étude démontre l'importance de USP14 dans les mécanismes de survie des cellules lymphoïdes malignes et l'intérêt de son ciblage dans l'élaboration de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Ceci ne tient pas uniquement à l'action de USP14 sur MCL-1, mais de façon plus générale, à son rôle dans l'activité du protéasome. L'importance du système ubiquitine-protéasome est illustrée en cancérologie par l'inhibiteur du protéasome bortezomib, utilisé dans le traitement du myélome multiple. Le bortezomib et de nouveaux inhibiteurs du protéasome sont d'ailleurs en test clinique afin de

développer ces thérapies (Crawford and Irvine, 2013; D'Arcy and Linder, 2012). Un autre intérêt de USP14 réside dans ses autres cibles et sa capacité à réguler les voies Wnt et NF- κ B qui sont d'autres voies de survie importantes dans les LNH (Gasparini et al., 2014; Ge and Wang, 2010).

Au-delà de USP14, nos travaux suggèrent l'implication d'autres DUBs dans la signalisation du BCR et l'action protectrice des cellules stromales. Ainsi, dans nos profils biochimiques, nous observons également des activités DUB pouvant correspondre à UCHL5, USP5, USP7 et OTUD5 (voir annexe I). UCHL5 est une autre DUB associée au protéasome qui joue un rôle important dans la prolifération et la survie des cellules de myélome multiple (Tian et al., 2014). USP5, USP7 et OTUD5 ont été décrites comme capable de réguler la voie p53 et sa voie de signalisation (Dayal et al., 2009; Kon et al., 2010). Tous ces travaux attestent de l'importance des DUBs dans les processus cancéreux et soulignent la nécessité d'une meilleure compréhension du système ubiquitine-protéasome et du fonctionnement des DUBs pour le développement de thérapies anti-tumorales ciblées (Crawford and Irvine, 2013).

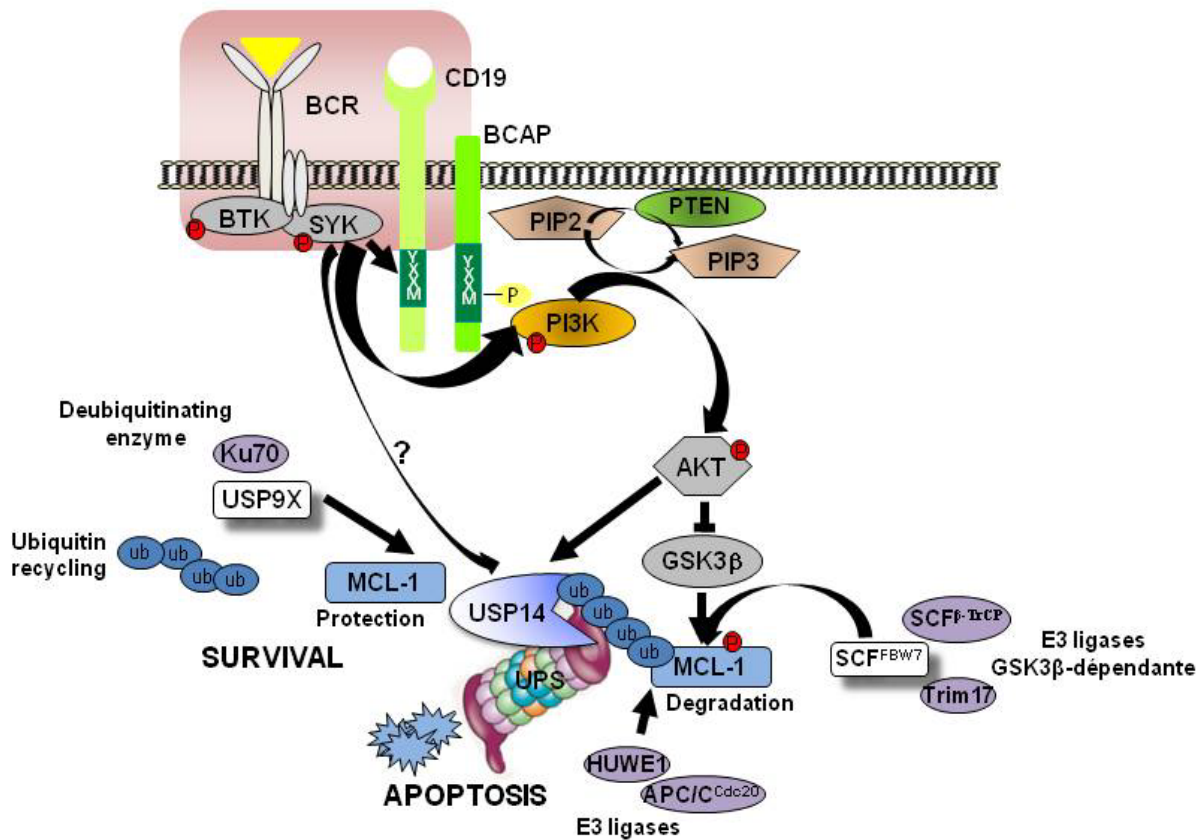


Figure 25 : La régulation de MCL-1 par le BCR, les E3 ligases et les DUBs

II. Article : FTY720 induces DRP1-dependent regulated necrosis in chronic lymphocytic leukemia

Résumé

Le fingolimod (FTY720), un analogue de la sphingosine, est un médicament immunosuppresseur, récemment approuvé pour le traitement de la sclérose en plaques et actuellement à l'étude préclinique comme possible thérapie pour un certain nombre d'hémopathies malignes. Le FTY720 a montré un rôle dans l'induction de l'autophagie et de la mort cellulaire indépendante des caspases. Mais les mécanismes mis en jeu restent peu clairs. Notre étude vise donc à obtenir une meilleure compréhension sur le mode d'action du FTY720. De fait, nos résultats indiquent que le FTY720 entraîne une mort de type nécrotique dépendante de DRP1 dans des cellules de leucémie lymphoïde chronique. Ces observations démontrent l'importance du fingolimod comme potentiel nouvel agent thérapeutique dans les hémopathies malignes.

Article

FTY720 induces DRP1-dependent regulated necrosis in chronic lymphocytic leukemia

Emilien Delmont^{1, 5, *}, Nicholas Dubois^{1, 3, *}, Guillaume Robert^{2, 3}, Emilien Garcia^{1, 3}, Frederic Larbret^{3,4}, Vincent Marechal⁸, Claude Desnuelle⁵, Patrick Auberger^{2, 3}, Pierre-Yves Jeandel^{1,6}, Michel Ticchioni^{1,7}, Sophie Tartare-Deckert^{1,3}, and Marcel Deckert^{1,3}

¹INSERM, U1065, C3M, Microenvironment, Signalisation and Cancer, Nice, France

²INSERM, U1065, C3M, Cell Death, Differentiation, Inflammation and Cancer, Nice, France

³Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France

⁴INSERM, U576, Flow cytometry facility, Hôpital Archet 1, Nice, France

⁵Centre de référence maladies neuromusculaires et SLA, ⁶Département de médecine interne, ⁷Service d'Immunologie, CHU de Nice, Nice, France

⁸Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, UMRS 872, France

*Equal contribution

Running title:

FTY720 and DRP1-dependent necrosis

Corresponding author:

Marcel Deckert, INSERM U1065/C3M, Team 11, Bâtiment Universitaire Archimed, 151 Route de Ginestière, BP 23194, F-06204 Nice cedex 3

France. Tel: 33 (0) 4 89 06 43 10. Fax: 33 (0) 4 89 06 42 21. E-mail: deckert@unice.fr

Abstract

Fingolimod (FTY720) is an immunosuppressive drug that was recently approved for the treatment of multiple sclerosis and is currently under pre-clinical investigation as a therapy for a number of haematological malignancies. Previous studies have indicated a role for FTY720 in inducing autophagy and caspase-independent cell death in cancer cells through incompletely characterized molecular mechanisms. Our study thus aims at a better understanding of the way of action of FTY720. In chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells, FTY720 induced cell death with typical features of apoptosis, including phosphatidylserine exposure and caspase-3 activation, and features of autophagy, including LC3 conversion, autophagolysosome formation and lysosomal cathepsins activation. However, neither caspase nor autophagy blockade prevented the cytotoxic effect of FTY720, suggesting another mechanism of cell death. Using electron and fluorescence microscopy, flow cytometry and biochemical analyses, we found that FTY720 treatment increased a fraction of annexin V⁻/7-AAD⁺ cells both in primary and transformed leukemic cells and induced morphological changes representative of necrosis, including oncosis, mitochondrial and plasma membrane alteration. FTY720 treatment resulted in increased plasma membrane permeability as shown by the extracellular translocation of the nuclear high mobility group box 1 (HMGB1) protein and by the release into the culture medium of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Interestingly, cell death induced by FTY720 was not prevented by pharmacological inhibition of RIPK1 and PP2A. In contrast, FTY720-induced necrosis was accompanied by an early relocation to the mitochondria of Dynamin-Related Protein 1, DRP1. Importantly, FTY720 stimulation led to major changes in the phosphorylation of serine residues associated with the mitochondrial fission activity of DRP1. Finally, siRNA-mediated knockdown of DRP1 and its upstream regulator phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) significantly reduced cell death induced by FTY720. In this study, we thus demonstrate that in leukemic cells the cytotoxic effect of the immunosuppressive drug Fingolimod involves a DRP1-dependent regulated necrosis. These observations are important in line of the future development of Fingolimod as a new therapeutic agent in haematological malignancies.

Keywords

Fingolimod, FTY720, necrosis, chronic lymphocytic leukemia, DRP1

Introduction

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the commonest form of leukaemia in Western countries (1). Available treatments generally induce remission, although nearly all the patients relapse and CLL remains an incurable disease. The purine analogue fludarabine, alone or in combination with cyclophosphamide and the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, has become the standard chemotherapy in most countries for CLL (2, 3). In the majority of cases, the treatment with fludarabine induces an apoptotic death dependent on the tumor suppressor p53. However, patients with mutation or loss of p53 have high risk to develop a CLL refractory to fludarabine and other usual chemotherapies (3). Despite clear advances in therapies targeting leukemic B cell signalling pathways (4), it is still a major issue to develop new therapeutic strategies in patients with CLL and poor prognosis factors.

Fingolimod (Gilenya, FTY720, 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol) is an oral immunosuppressive drug approved in the management of Multiple Sclerosis (MS) (5, 6). FTY720 is a structural analogue of sphingosine, an 18-carbon amino alcohol member of cell membrane sphingolipids (7). Upon phosphorylation by type 1 or type 2 sphingosine kinases (SPHK1 and SPHK2), sphingosine is modified into sphingosine-1-phosphate (S1P), which functions as an important signalling molecule during lymphocyte trafficking (8). S1P can be degraded into phosphoethanolamine by S1P lyase or further metabolized into ceramide, another potent signalling lipid in cell proliferation and cell death. Similar to sphingosine, fingolimod can be phosphorylated by SPHK1/2 (7, 9). Binding of fingolimod phosphate (FTY720-P) to sphingosine-1-phosphate receptors (S1PRs) expressed by lymphocytes induces their internalization and inhibition (10). During MS treatment with fingolimod, this process results in the blocking of lymphocyte egress from lymph nodes, preventing autoimmune lymphocytes from contributing to the harmful autoimmune reaction (11). Recent studies have indicated a role for fingolimod in inducing cell death in a variety of human and mice cancer models, including solid tumors (12-16) and hematological malignancies (17-20). The cytotoxic effects of fingolimod appear highly cell context dependent and a variety of cell death mechanisms have been associated to fingolimod treatment, including apoptosis (13), caspase-independent cell death (17, 20), increased autophagic flux (14, 17) and necrosis (14, 16). At the molecular level, how fingolimod triggers cell death is unclear (21). In prostate cancer, fingolimod has been shown to sensitize tumor cells to radiotherapy through inhibition of SPHK1 independently of S1PRs (15). More recently, studies in lung adenocarcinoma, Jak2V617F-driven myeloproliferative neoplasms and chronic myeloid leukemic stem cells have implicated a I2PP2A/SET-mediated activation of the tumor suppressor protein phosphatase 2A (PP2A) (16, 18, 22). In CLL cells, FTY720-induced toxicity was also

linked to PP2A activation (20). However, the exact underlying molecular mechanisms of fingolimod antileukemic activity are still ill defined.

In this study, we found that fingolimod activated apoptotic and autophagic events that were unnecessary to its effects on CLL cell death. Instead, fingolimod treatment induced morphological and biochemical events that were typical of cells undergoing necrotic death, including oncosis, mitochondrial alteration and increased plasma membrane permeability associated with the extracellular release of high mobility group box 1 (HMGB1) protein and lactate dehydrogenase (LDH). Fingolimod-induced cell death required neither RIPK1 nor PP2A activity, but was associated with the mitochondrial relocation of phosphorylated Dynamin-Related Protein 1 (DRP1). Consistently, knockdown of DRP1 and PGAM5 expression in CLL cells impaired FTY720-induced cell death. These observations have important clinical implications since Fingolimod is now largely considered as a potential therapeutic agent in haematological malignancies.

Results

Fingolimod and sphingosine induced caspase-independent death of CLL cells. The exact mechanism of cytotoxicity of Fingolimod (FTY720) on CLL cells is still ill defined. To model the action of FTY720 in vitro, we used the MEC1 cell line that was established from a patient with B CLL in prolymphocytoid transformation (23). Treatment with increasing concentration of FTY720 and of its cellular analogue sphingosine for 24, 48 and 72 h resulted in a dose-dependent reduction in cell viability in MEC1 cells (Figure 1a and 1b). IC₅₀ value for FTY720 was calculated at 7 μ M in MEC1 cell line, whereas IC₅₀ value for sphingosine was calculated at 12 μ M (Figure 1b). FTY720 and sphingosine can be phosphorylated by intracellular sphingosine kinase (7). We therefore addressed the level of toxicity of FTY720-P and sphingosine-1-phosphate (S1P) in CLL cells. As shown in Figure 1c, neither FTY720-P nor S1P had significant cytotoxic activities in MEC1 cells. Consistently, an inhibitor of sphingosine kinases (SKI) cooperated with FTY720 and sphingosine to decrease MEC1 cell survival (Figure 1c). The effect of FTY720 and sphingosine on cell death induction was confirmed with primary leukemic cells obtained from CLL patients (Figure 1d).

Next we investigated the biochemical pathways involved in the antileukemic activity of FTY720 and sphingosine. Following treatment of MEC1 cells with FTY720 and sphingosine, the cleavage of two apoptosis markers, caspase 3 and PARP1 was observed (Figure 2a). Consistent with their lack of cytotoxic activities, FTY720-P and S1P had not effect on these biochemical events typical of apoptotic cell death.

Caspase 3 activation by FTY720 and sphingosine was confirmed by directly assessing its activity on cell lysates obtained from treated leukemic cells (Figure 2b). However, incubation of primary leukemic cells with the pan-caspase inhibitor QVD-Oph did not prevent FTY720-induced cell death measured by flow cytometric analysis of Annexin V and 7-AAD staining, in contrast to what was observed with the proapoptotic compound staurosporine (STS) (Figure 2c). The efficient blockade of caspase 3 by QVD-Oph was shown further by the analysis of its effect on FTY720-induced caspase 3 activity measured by intracellular flow cytometry (Figure 2d). Another pan-caspase inhibitor, ZVAD-fmk, that prevented the proteolytic processing of procaspase 3 and PARP1 in MEC1 cells, also failed to block cell death (Supplementary Figure S1).

Cell death induced by Fingolimod was associated with autophagolysosome formation and increased cathepsin activities. In order to evaluate the role of autophagy in cell death induced by Fingolimod, we first assessed the effect of FTY720 and sphingosine in MEC1 cells stably transfected with mCherry-LC3 (Supplementary Figure S2). Since the redistribution of LC3 to the autophagosomal membranes is associated to the process of autophagy (24), examination of the cellular location of fluorescent LC3 allows the quantification of autophagosome formation (25). Following treatment with FTY720 and sphingosine, mCherry-LC3 redistributed from a diffuse cytoplasmic pattern to a punctate pattern of vesicles stained by the lysosome specific fluorescent dye LysoTracker Green, indicating that these compounds effectively increased the formation of autophagolysosomes in the leukemic cells (Figure 3a). The ultrastructural morphological changes associated with the formation of autophagosomes were confirmed by transmission electron microscopy analysis. MEC1 cells treated with FTY720 exhibit typical features of cells undergoing autophagy such as large vacuoles with double membrane containing digested materials (Figure 3b, arrows). During autophagosome formation, the cytosolic form of LC3, LC3-I is matured into the autophagosome-associated form LC3-II detectable by immunoblot analysis. As shown in Figure 3c, FTY720 and sphingosine, but not their phosphorylated forms FTY720-P and S1P, induced the conversion of LC3-I to LC3-II. Of note, treatment of primary leukemic cells with FTY720 led to a similar LC3-I to LC3-II conversion, whereas the apoptosis inducer staurosporine had no effect on LC3 conversion (Supplementary Figure S3). The effect of FTY720 on autophagic flux was further supported by the observations that the lysosomal inhibitor bafilomycin A1 prevented the effect of FTY720 on the reduction of the protein levels of p62/SQSTM, a marker of autophagic activity (26) (Supplementary Figure S4). Further supporting the notion that FTY720 and sphingosine activated the lysosomal pathway, we found that FTY720 and sphingosine significantly increased the activity of two lysosomal proteases, cathepsin B and L, a process usually associated with lysosomal membrane permeabilization (Figure 3d). Together,

these results indicate that both FTY720 and sphingosine induces autophagy in CLL cells. Because cases of cell death by autophagy have been reported (27), we thus examined the effect of bafilomycin A1 and 3-methyladenine (3MA), two inhibitors of the early and late stages of the autophagy pathway (28), on FTY720-induced cell death. When incubated in the presence of QVD-Oph in order to prevent the basal toxicity of bafilomycin A1 and 3MA in leukemic cells (data not shown), both compounds cooperated with FTY720 to further decrease cell survival (Figure 3e). Moreover, the cathepsin inhibitor CA-074Me (29) failed to prevent the cytotoxicity of FTY720 and sphingosine (Figure 3f), although it effectively blocked cathepsin B/L in vitro activities (data not shown). These results indicate that autophagic cell death does not impart the cytotoxic activities of FTY720 and sphingosine on CLL cells and also that apoptosis is not responsible for the accentuated cell death observed when autophagy is blocked.

Fingolimod and sphingosine induces necrotic cell death in CLL cells. Next we examined the possibility that FTY720 treated leukemic cells underwent necrotic cell death. Necrosis is a form of cell death with typical morphological and biochemical features, including oncosis, plasma membrane permeabilization (PMP) and release of cellular content in the extracellular milieu (30, 31). First, we examined by flow cytometry the incorporation of the exclusion dye 7-AAD in FTY720-treated MEC1 cells in the presence of the pan-caspase inhibitor QVD-Oph. As shown in Figure 4a, FTY720 and sphingosine, but not by their phosphorylated forms FTY720-P and S1P significantly increased the fraction of Annexin V negative and 7-AAD positive cells. FTY720 and sphingosine treatment had similar effect on 7-AAD incorporation compared to the treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂), a typical inducer of necrotic cell death. In contrast, the apoptotic compound staurosporine had no significant effect of 7-AAD staining. When assayed in QVD-Oph-treated primary leukemic cells purified from 6 different patients with CLL, we confirmed the observations that FTY720, but not staurosporine, increased incorporation of 7-AAD (Figure 4b). Next, the morphological features typically associated with necrosis were investigated by electron microscopy analysis (Figure 4c). In contrast to untreated cells, FTY720 and sphingosine-treated cells displayed several traits of necrosis, including increased cell volume, organelles swelling and loss of mitochondrial ultrastructure, condensation of chromatin into small irregular patches, disruption of the plasma cell membrane and translucent cytoplasm. Induction of PMP by FTY720 and sphingosine was also evidenced by the increased release of lactate dehydrogenase in cell culture supernatants (Figure 4d). In contrast, neither FTY720-P nor S1P were able to induce membrane permeabilization in leukemic cells. As a control, the apoptosis inducer staurosporine also failed to induce PMP.

The measure of the extracellular release of the chromatin-binding protein HMGB1 (high mobility group box 1) is a common method for assessing necrotic cell death (31)). Using MEC1 cells stably transfected

with HMGB1-EGFP (Supplementary Figure S5), we first observed by fluorescence microscopy that addition of FTY720 and sphingosine to the cells resulted in the translocation of HMGB1-EGFP from the nucleus to the cytoplasm (Figure 5a). Cellular fractionation further showed that endogenous HMGB1 was already detectable in the cytoplasm of MEC1 cells 6 h following the addition of FTY720 (Figure 5b). Finally, immunoblot analysis performed on culture supernatants from HMGB1-EGFP transfected cells showed that only FTY720 and sphingosine had the capacity to induce the release into the extracellular milieu of HMGB1, in contrast to their phosphorylated counterparts or the two apoptosis inducers staurosporine and BAY61-3606 (32) (Figure 5c). Collectively, these data indicate the ability of Fingolimod and its cellular counterpart sphingosine to induce a necrotic cell death in CLL cells.

FTY720-induced necrotic cell death proceeds independently of RIPK1 and PP2A in CLL cells. A major form of necrotic cell death is mediated by the receptor interacting protein (RIP) kinase 1 (RIPK1) downstream tumour necrosis factor (TNF) receptor 1 (TNFR1) (33). In order to test whether the pathway of necrotic death induced by Fingolimod involves RIPK1 activation, we incubated cells treated with FTY720 and QVD-Oph in the presence of the selective RIPK1 inhibitor, Necrostatin-1 (34), and measured cell viability. In MEC1 CLL cells, Necrostatin-1 failed to prevent the cytotoxic effect of FTY720 and of STS. As a control, cell death induced by TNF α in the presence of QVD-Oph was blocked by Necrostatin-1 in the promonocytic leukemia cells U937 (Figure 6a).

The caspase-independent death of CLL cells induced by FTY720 has been linked to the activity of the tumor suppressor PP2A, and treatment with the PP2A inhibitor okadaic acid (OA) reduced FTY720-induced cell toxicity (20). We therefore tested the impact of PP2A inhibition on cell death induction by FTY720 in our system. In MEC1 cells treated or not with FTY720 and QVD-Oph in the presence of increasing doses of okadaic acid, we observed no effect on the decrease viability induced by FTY720. At higher concentrations, okadaic acid was even toxic by itself (Figure 6b). Similar results were obtained when we evaluated the impact of okadaic acid on FTY720-induced death of primary leukemic cells from CLL patients (data not shown).

FTY720-induced necrotic CLL cell death requires the expression of DRP1. DRP1 (Dynamin Related Protein 1) is a cytosolic protein involved in regulation of mitochondrial fission upon its signal-induced phosphorylation, translocation and oligomerization at the mitochondrial membrane (35, 36). Recent studies have involved DRP1 in several forms of necrotic cell death, including caspase-independent

leukemic cell death (37), neuronal cell death (38) and programmed necrosis mediated by RIPK family (39). To examine if the necrotic cell death caused by FTY720 treatment implicates DRP1, we first used cell fractionation assay and immunoblot analysis of DRP1 location and phosphorylation in MEC1 cells. FTY720 treatment induced a prompt relocation (< 15 min) of DRP1 from the cytosol to the membrane/organelle fraction enriched in mitochondria as evidenced by VDAC1 (Voltage-dependent anion channel 1) immunoblot (Figure 7a). The relocation of DRP1 to mitochondria, which was observed up to 2h following FTY720 treatment, was accompanied by a decreased phosphorylation of DRP1 on serine 637 and serine 616, two sites associated with changes in the activity of DRP1 (39-41). Interestingly, increased phosphorylation of DRP1 serine 616 was observed after 2 h of FTY720 stimulation. The modulation of DRP1 phosphorylation was paralleled by a rapid disparition of the phosphorylated forms of ERK1/2 and Akt, whereas increased phosphorylation of p38 was observed in the cytosol of FTY720-treated cells. When membrane/organelle protein extracts were separated under nonreducing conditions, a form of DRP1 migrating with higher apparent molecular weight was observed upon 30 min of FTY720 stimulation, indicating that FTY720 led to DRP1 dimerization at the mitochondria (Figure 7b). The specificity of the anti-DRP1 immunoblots under reduced *versus* unreduced conditions was confirmed in siRNA-mediated DRP1 knockdown cells (Supplemental Figure S6). Fluorescence microscopy analyses performed on MEC1 cells shortly transfected with EGFP-DRP1 further confirmed that FTY720 induced a massive translocation of DRP1 from the cytosol to the mitochondria as evidenced by the co-localization of EGFP-DRP1 with the mitochondrial fluorescent probe Mitotracker following 2 h of FTY720 treatment (Figure 7b). In addition, whereas longer overexpression of EGFP-DRP1 proteins in CLL cells resulted in the aggravation of cell death induced by FTY720 (Figure 7c), the reduction of endogenous DRP1 expression by siRNAs against DRP1 significantly impaired the cytotoxic activity of FTY720 in both MEC1 cells (Figure 7d) and primary CLL cells (Supplementary Figure S7). PGAM5 (phosphoglycerate mutase family member 5) is a serine/threonine phosphatase involved in programmed necrosis mediated by DRP1-dependent mitochondrial fragmentation following exposition to reactive oxygen species (ROS) (39). Consistently, we observed that the incubation of MEC1 cells with FTY720 and sphingosine for 30 min generated a significant amount of ROS as compared to H₂O₂ treatment (Figure 8a), and that PGAM5 knockdown impaired CLL cell death induced by FTY720 (Figure 8b).

Discussion

Fingolimod (FTY720) is used as an immunosuppressive drug in Multiple Sclerosis (MS) (6). This effect is mediated by phosphorylated FTY720 through S1P receptors at low nanomolar concentrations (42). The cytotoxic effect induced by FTY720 requires higher concentration of drug than for its immunosuppressive

action. To induce cytotoxicity, the IC_{50} of FTY720 treatment ranges from 4 to $13\mu M$ depending of the type of neoplastic cells (14) (17, 20) (16, 18). However, high doses of FTY720 up to 10mg/kg/day have been administrated orally or intraperitoneally to mice with anti-neoplastic effect, without any apparent toxicity (16, 43). S1P and phosphorylated FTY720 neither induced autophagy nor cell death in CLL cells, and S1P failed to rescue MEC1 cells from death induced by FTY720. In addition, a sphingosine kinase inhibitor, that is known to inhibit the phosphorylation of FTY720 and sphingosine, increased their cytotoxicity in CLL cells. All these data indicate that FTY720 cytotoxicity is not mediated by FTY720-P through S1P receptors, consistent with previous reports (16, 20, 43).

FTY720 has a cytotoxic effect in various types of cancer, but the exact underlying mechanisms are still unclear (21). Several studies indicate a cell type-specific effect of FTY720. It induces caspase-dependent apoptosis in both MCF7 breast cancer cells (12) and Huh7 hepatoma cells (13), whereas inhibition of caspase does not inhibit its cytotoxicity in ovarian cancer (14) and in haematological cancers (17, 19, 20), in agreement with our observations in CLL cells. Despite induction of autophagy in CLL cells, as well as in other cancers (14, 17), FTY720 did not cause autophagic CLL cell death and autophagy inhibitors aggravated its antileukemic activity. Autophagy is a lysosomal degradation pathway that is essential for survival, differentiation and homeostasis, and principally serves an adaptive role to protect organisms against diverse pathologies, including infections, cancer, and neurodegeneration. The autophagic process caused by FTY720 may thus serve as a defense mechanism in leukemic cells against the stress caused by its own cytotoxic activity. In line with this notion, FTY720 stimulation induced a rapid phosphorylation of the MAPK p38, a kinase involved in stress responses. Thus, the apoptotic features that we observed in CLL cells stimulated by FTY720 and its cellular analogue sphingosine can thus be seen as the failure to adapt to cellular stress through the autophagic pathway. In addition, the observed activation of effector caspases could be the consequence of the FTY720-induced release of cathepsins B and L, a group of lysosomal cysteine proteases that have been linked to the activation of the mitochondrial pathway of apoptosis (44) (45). Consistently, the conversion of sphingomyelin into sphingosine is an important trigger of lysosomal apoptosis (45) and $TNF\alpha$ -induced lysosomal membrane permeabilization (LMP) (46).

Nevertheless, the fact that inhibition of both autophagy and apoptosis did not prevent the cytotoxic action of FTY720 in CLL cells led us to examine its action on necrosis, a third type of cell death mechanism long regarded as a passive and unregulated process (33). Previous studies showed that FTY720 induced caspase-independent cell death or necrosis in ovarian cancer (14), lung tumor (16), and leukemia (17, 20). In our study, CLL cells treated with FTY720 clearly displayed both morphological and biochemical features of cells undergoing necrosis (31, 33), including cytoplasmic swelling, mitochondrial and plasma

membrane alteration, activation of cathepsins, nuclear dye staining, and extracellular release of the nuclear protein HMGB1 and of the cytosolic enzyme LDH.

Recent studies have implicated the binding of FTY720 to the inhibitor of PP2A, I2PP2A/SET, in the killing effect of FTY720 (16, 18, 22). In CLL cells, FTY720-induced caspase independent cell death was also linked to PP2A activation (20) and the oncoprotein SET was found overexpressed (47). However, we found no evidence that the toxicity of FTY720 in CLL cells involved PP2A activity, because the PP2A inhibitor okadaic acid could not prevent the effect of FTY720 on cell death at a range of concentrations from 0.1 to 100 nM, even in the presence of the apoptosis inhibitor QVD-OPH. Currently, the reason for this discrepancy is unknown but the activation of PP2A downstream FTY720 was not implicated in several other malignancies, such as acute lymphoblastic leukemia (17), ovarian (14) and hepatocellular carcinomas (13). Another molecular pathway leading to regulated necrosis is initiated by the ligation of death receptors, such as CD95, TNFR1/2 and TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors (TRAILR1/2), in the presence of either endogenous or exogenous inhibitors of apoptosis. The process of regulated necrosis also requires the activity of RIPK1/3 (33). Interestingly, the PP2A-dependent killing effect of FTY720 in lung cancer was recently linked to the activation of RIPK1 (16). In contrast, the cytotoxicity of FTY720 in CLL cells appears independent of RIPK1 activity, because Necrostatin-1, a highly specific inhibitor of RIPK1 (34), could not prevent the loss of cell viability induced by FTY720 in leukemic cells. This could reflect the recently described inability of CLL cells to assemble a ripoptosome complex upon IAP degradation (48). However, the implication of RIPK3 in FTY720-induced necroptosis in CLL cells can not be rule out, in line of a recent study that has indicated that RIPK1 is not mandatory in programmed necrotic death caused by TNFa (49).

In addition to lysosomal and plasma membranes ruptures, necroptosis involves the active impairment of mitochondrial functions (33). Recent reports have implicated the regulator of mitochondrial fission, DRP1 (35), in multiple necrosis pathways (39). Mitochondria dynamics involve constant fusion and fission processes that play a crucial role in the maintenance of mitochondrial functions and in cellular adaptation to physiological and pathological cues. In mammalian cells, binding of DRP1 to Fis1 and Mff on the outer mitochondrial membrane regulates mitochondrial fission, whereas mitochondrial fusion relies on mitofusins and optic atrophy 1 (OPA1) (36, 50). Importantly, the activity of DRP1 is regulated by post-translational modifications, such as reversible phosphorylation events (36). Notably, DRP1 activity and mitochondrial fission are prevented when DRP1 is phosphorylated by cyclic AMP-dependent kinase (PKA) at serine 637 phosphorylation (40, 41). In this study, we found that siRNA-mediated knockdown of DRP1 significantly reduced the killing effect of FTY720 in CLL cells, whereas DRP1 overexpression dramatically increased cell death. FTY720 treatment also caused a very rapid relocation of DRP1 to

mitochondria, accompanied by dephosphorylation of DRP1 at serine 637 in leukemic cells. Interestingly, a previous study has shown that DRP1 expression correlated with the susceptibility of normal and leukemic B cells to undergo regulated necrosis following the engagement of CD47 (37). Consistent with FTY720-mediated events involved in CLL cells necrosis, CD47 ligation on B cells resulted in the translocation of DRP1 from the cytosol to mitochondria, impairment of the mitochondrial electron transport chain, a drop in ATP levels and ROS generation (37). The mitochondrial protein phosphatase phosphoglycerate mutase/protein phosphatase 5, PGAM5 was recently identified as a DRP1 serine 637 phosphatase during extrinsic necrosis caused by TNF α and intrinsic necrosis caused by calcium overload and ROS production (39). In line with these results, FTY720 and sphingosine treatment promotes a rapid increase in ROS production in CLL cells that is consistent with the kinetics of DRP1 activation and the suppression of PGAM5 expression impaired FTY720-induced cytotoxicity. Of note, similar early generation of ROS have been reported in other cancer cells exposed to FTY720 (17) (Liu, CCR 2010, 16/3182, MCL), and a link between sphingolipids metabolism and the release of ROS by the mitochondria has been described (51-53). Because C16-ceramide and sphingosine have been shown to inhibit complex IV activity in isolated mitochondria (53), one can speculate that exposition to FTY720 affects the respiratory chain of CLL cells, resulting in ROS production and PGAM5 activation. Together with the release of lysosomal proteases that are critical actors of cell death pathways (45), the destabilization of mitochondria by FTY720 is likely to explain the multiple intricate events of cell death observed in FTY720-treated CLL cells. Finally, a late increase in the phosphorylation of DRP1 at serine 616 was also observed following FTY720 stimulation. Because the phosphorylation by cyclin-dependent kinase Cdk1 at serine 616 has been linked to DRP1-mediated mitochondrial fission during mitosis (54), the significance of this event for FTY720-mediated cell death is unclear. However, it is possible that DRP1 serine 616 represents a substrate for other kinases involved in the regulation of intrinsic necrotic death pathways.

In conclusion, we propose that the treatment of CLL cells by Fingolimod mimics some intracellular effects of sphingosine, including ROS generation, lysosomal membrane permeabilization and cathepsins activation. In addition to mitochondrial uncoupling and lipid peroxidation (33), ROS would activate PGAM5, leading to DRP1 dephosphorylation at the mitochondria outer membrane, increased mitochondrial fragmentation activity and subsequent necrosis (Figure 8c). The combination of fludarabine, rituximab and cyclophosphamide has significantly improved the outcome of patients with CLL. Regardless to this success, some patients relapse and develop neoplastic cells resistant to conventional therapy and apoptotic cell death (3). In this context, the pronecrotic activity of FTY720 should prove clinically useful in the treatment of refractory CLL.

Materials and Methods

Cell lines, Primary cell preparation and culture conditions. The human B chronic lymphocytic leukemia cell line MEC1 (23) was from DSMZ (Germany). The human promonocytic leukemia cell line U937 was from the American Type Culture Collection (ATCC). Primary CLL cells were obtained at the Nice University Hospital (CHU Nice) from peripheral blood samples of CLL patients after informed consent. The diagnosis of CLL was based on clinical and immunophenotypic criteria (1). All patients included in this study were either untreated or had not received chemotherapy or steroids for at least 6 months prior to the investigation. Peripheral mononuclear cells were isolated from peripheral blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Leukemic B cells were isolated by magnetic selection as previously described (32, 55). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, UK) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Medium was supplemented with 10% foetal bovine serum (Hyclone, USA), 1% penicillin G/streptomycin, and 1% pyruvate (Gibco).

Reagents, Antibodies, siRNA and Plasmids. Sphingosine, phosphorylated form of sphingosine (S1P), staurosporine (STS), bafilomycin, 3-methyl adenosine (3MA), TNF α were provided by Sigma Aldrich (St Louis, MI), sphingosine kinase inhibitor 2, FTY720phosphate by Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), FTY720 by Calbiochem (La Jolla, CA), QVD-OPH by MP-Biomedicals (Aurora, OH) and Necrostatin-1 by Enzo (France). Antibodies against Caspase-3, LCR, HMGB1, VDAC-1, phosphorylated forms of DRP1, P-p38MAPK, P-JNK, SMAC and HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), against PARP-1 from Calbiochem (La Jolla, CA), against α -tubulin from Sigma Aldrich (St Louis, MI), against nucleoporine, DRP-1, PGAM5 and ERK2 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). DRP1 and PGAM5 siRNA were from Santa Cruz Biotechnology and Dharmacon, respectively. The plasmid for HMGB1-EGFP was described before (56). The plasmid encoding EGFP-DRP1 was a kind gift from M. Schrader (57). To generate the mCherry-LC3 construct, GFP cDNA from a GFP-LC3 plasmid (Cell Biolabs) was replaced by mCherry sequence using BsrG1 and SalI enzymes. mCherry-LC3 cDNA was then cloned into pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP.WPRE vector (Addgene plasmid #12252) using AgeI and SalI restriction sites in place of EGFP cDNA.

Analysis of ROS production and cell viability. Cells were seeded in triplicates into 96-well plates. After the indicated treatments at 37°C, cell metabolism was measured by a MTS conversion assay using the CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation kit (Promega, Madison WI) according to the manufacturer instructions. Cell death was assessed by flow cytometry (BD FACSCanto II, BD Biosciences) following staining with Annexin V-PE/7-AAD (BD Pharmingen) as previously described (32), or by measurement of LDH release using the CytoTox-ONE homogeneous membrane integrity assay as recommended by the

manufacturer (Promega). Cellular ROS detection was performed using carboxy-H₂DCFDA staining according to the manufacturer's instructions (Invitrogen), followed by flow cytometry analysis.

Caspase-3 and Cathepsin activity measurement. After stimulation, cells were lysed for 30 minutes at 4°C in lysis buffer (50 mM TRIS pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) and cellular extracts were incubated in 96-well plates with z-FR-AMC (cathepsin B/L) or Ac-DEVD-AMC (caspase 3) as substrates at 37°C. Cathepsin and caspase-3 activities were measured by following emission at 460nm (excitation at 390nm). Enzyme activities were expressed as arbitrary units/mg of protein. Each experiment was performed in quadruplicates and repeated at least three times. Caspase-3 activity was also measured by flow cytometry using anti-active caspase-3-FITC antibody (BD Pharmingen) as described before (32).

Cell transfection. Stable transfections into MEC1 cells were performed by electroporation (270mV, 975µF) using a Gene Pulser system (Bio-Rad Laboratories). Transfected cells were transferred to 37°C preheated medium and after 24 hrs at 37°C, 5% CO₂, cells were selected in geneticin-containing culture medium. Transient transfections into MEC1 or primary leukemic cells were performed using the AMAXA nucleofection system (Lonza, Switzerland) as previously described (32).

Subcellular fractionation and Western blot analysis. For preparation of nuclear, microsomal and cytoplasmic protein extracts, cell extracts from 1x10⁶ were prepared using the ProteoExtract Subcellular proteome extraction kit (Merck, Germany), according to the manufacturer instructions. For preparation of whole-cell lysates, cells were lysed in ice-cold lysis buffer: 1% Triton X-100 in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics) for 30 min on ice. Lysates were clarified by centrifugation at 15,000 g for 15 minutes at 4°C. Protein extracts (30 µg per lane) were then separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were probed by immunoblotting with primary and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated proper secondary antibodies followed by enhanced chemiluminescence detection. Intensity of the bands was evaluated and optic densities (OD) were compared using ImageJ software.

Fluorescence microscopy. Cells stably transfected with mCherry-LC3 or HMGB1-EGFP were seeded onto sterile chamber slide and treated with different reagents for the indicated times at 37°C. Cells were then incubated with 300 nM DAPI (Sigma-Aldrich) in the presence or not of 100 nM LysoTracker Green (Invitrogen) for 30 min at 37°C, centrifugated and resuspended in fresh prewarmed culture medium. Cells were then analyzed using a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope (Zeiss Leica Microsystems, ON) equipped by a Hamamatsu ORCA-ER digital camera (Hamamatsu, Japan). Image analysis was performed with Volocity software (Improvision Inc, Waltham, MA). The EGFP-DRP1 vector was transfected into MEC1 cells for 4 h at 37°C in the presence of QVD-OPH. Cells were then treated or not with 10µM FTY720 for the next 2

h and incubated with 100 nM Mitotracker Red (Invitrogen) for 30 min. Cells were washed, fixed and mounted in Mowiol 4-88 (Sigma) prior to confocal microscopy analysis performed as described before (Larbret, 2013).

Electron microscopy. Electron microscopy was performed on the CCMA EM Core facility (University of Nice Sophia Antipolis). Cells were pelleted and fixed with 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 at room temperature, washed with the same buffer, and then postfixed with 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferricyanid. Finally, cells were rinsed with distilled water, dehydrated with ethanol and embedded in Epon. Ultrathin sections were contrasted with 4% uranyl acetate and lead nitrate and examined under a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope equipped with a Morada CCD camera (Olympus).

Statistical analysis. Comparisons between two groups were performed using the Wilcoxon signed rank test for paired measures and between multiple groups using the Friedman test. Difference was statistically significant for $p < 0.05$.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and in part by a grant from the Association Laurette Fugain and Fondation ARC. N.D. was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche and by a doctoral fellowship from Fondation ARC. The authors greatly acknowledge S. Pagnotta and the CCMA (Centre Commun de Microscopie Appliquée, University of Nice Sophia Antipolis, Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA) for electron microscopy analysis, and D. Alcor (INSERM U1065/C3M, Nice, France) for assistance with confocal microscope.

References

1. **Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008 Mar 22; 371 (9617): 1017-1029.**
2. **Steurer M, Pall G, Richards S, Schwarzer G, Bohlius J, Greil R. Single-agent purine analogues for the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2006 Aug; 32 (5): 377-389.**

3. Zenz T, Gribben JG, Hallek M, Dohner H, Keating MJ, Stilgenbauer S. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood* 2012 May 3; 119 (18): 4101-4107.
4. Ramsay AD, Rodriguez-Justo M. Chronic lymphocytic leukaemia--the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *Br J Haematol* 2013 Jul; 162 (1): 15-24.
5. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010 Feb 4; 362 (5): 387-401.
6. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012 Jan 26; 366 (4): 339-347.
7. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008 Jun; 60 (2): 181-195.
8. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 127-159.
9. Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett* 2003 Nov 6; 554 (1-2): 189-193.
10. Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther* 2005 Dec; 108 (3): 308-319.
11. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, *et al.* Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2010 Nov; 9 (11): 883-897.
12. Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, Wang JD, Itoh Y, Otsuki Y, *et al.* Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res* 2002 Mar 1; 62 (5): 1410-1419.
13. Hung JH, Lu YS, Wang YC, Ma YH, Wang DS, Kulp SK, *et al.* FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling. *Cancer Res* 2008 Feb 15; 68 (4): 1204-1212.
14. Zhang N, Qi Y, Wadham C, Wang L, Warren A, Di W, *et al.* FTY720 induces necrotic cell

- death and autophagy in ovarian cancer cells: a protective role of autophagy. *Autophagy* 2010 Nov; 6 (8): 1157-1167.
15. Pchejetski D, Bohler T, Brizuela L, Sauer L, Doumerc N, Golzio M, *et al.* FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer Res* 2010 Nov 1; 70 (21): 8651-8661.
 16. Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, Ward KE, Mukhopadhyay A, Oaks J, *et al.* Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med* 2012 Jan; 5 (1): 105-121.
 17. Wallington-Beddoe CT, Hewson J, Bradstock KF, Bendall LJ. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. *Autophagy* 2011 Jul; 7 (7): 707-715.
 18. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Ellis JJ, *et al.* PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest* 2013 Sep 3.
 19. Liu Q, Alinari L, Chen CS, Yan F, Dalton JT, Lapalombella R, *et al.* FTY720 shows promising in vitro and in vivo preclinical activity by downmodulating Cyclin D1 and phospho-Akt in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2010 Jun 15; 16 (12): 3182-3192.
 20. Liu Q, Zhao X, Frizzera F, Ma Y, Santhanam R, Jarjoura D, *et al.* FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood* 2008 Jan 1; 111 (1): 275-284.
 21. Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, Pitson SM. Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *Curr Mol Med* 2012 Dec; 12 (10): 1207-1219.
 22. Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Roof S, Harb JG, Ferenchak G, *et al.* Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood* 2013 Sep 12; 122 (11): 1923-1934.
 23. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, *et al.* MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res* 1999 Feb; 23 (2): 127-136.

24. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000 Nov 1; 19 (21): 5720-5728.
25. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008 Feb; 4 (2): 151-175.
26. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005 Nov 21; 171 (4): 603-614.
27. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Dec; 9 (12): 1004-1010.
28. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012 Jan; 19 (1): 107-120.
29. Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, *et al.* Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* 1998 May; 10 (5): 1723-1733.
30. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* 2010 Jun; 17 (6): 922-930.
31. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011 Mar; 10 (3): 221-237.
32. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, Maurer U, Tartare-Deckert S, Raynaud SD, *et al.* The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* 2009 Sep 17; 28 (37): 3261-3273.
33. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Oct; 11 (10): 700-714.

34. Degtarev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008 May; 4 (5): 313-321.
35. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001 Aug; 12 (8): 2245-2256.
36. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Dec; 11 (12): 872-884.
37. Bras M, Yuste VJ, Roue G, Barbier S, Sancho P, Virely C, *et al.* Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 2007 Oct; 27 (20): 7073-7088.
38. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2008 Jul; 9 (7): 505-518.
39. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 2012 Jan 20; 148 (1-2): 228-243.
40. Chang CR, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 2007 Jul 27; 282 (30): 21583-21587.
41. Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 2007 Oct; 8 (10): 939-944.
42. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 2007 Jul; 115 (1): 84-105.
43. Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ, Eiring AM, Notari M, Blaser BW, *et al.* FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2007 Sep; 117 (9): 2408-2421.

44. Kirkegaard T, Jaattela M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009 Apr; 1793 (4): 746-754.
45. Cesen MH, Pegan K, Spes A, Turk B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res* 2012 Jul 1; 318 (11): 1245-1251.
46. Ullio C, Casas J, Brunk UT, Sala G, Fabrias G, Ghidoni R, *et al.* Sphingosine mediates TNFalpha-induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells. *J Lipid Res* 2012 Jun; 53 (6): 1134-1143.
47. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, *et al.* SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood* 2011 Oct 13; 118 (15): 4150-4158.
48. Maas C, Tromp JM, van Laar J, Thijssen R, Elias JA, Malara A, *et al.* CLL cells are resistant to smac mimetics because of an inability to form a ripoptosome complex. *Cell Death Dis* 2013; 4: e782.
49. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, *et al.* TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis* 2013; 4: e465.
50. Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem* 2011 Mar; 149 (3): 241-251.
51. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 1997 Apr 25; 272 (17): 11369-11377.
52. Won JS, Singh I. Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic Biol Med* 2006 Jun 1; 40 (11): 1875-1888.
53. Zigdon H, Kogot-Levin A, Park JW, Goldschmidt R, Kelly S, Merrill AH, Jr., *et al.* Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 2013 Feb 15; 288 (7): 4947-4956.
54. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-

related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 2007 Apr 13; 282 (15): 11521-11529.

55. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, Deckert M, *et al.* Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 2007 Nov 1; 26 (50): 7081-7091.
56. Pallier C, Scaffidi P, Chopineau-Proust S, Agresti A, Nordmann P, Bianchi ME, *et al.* Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 2003 Aug; 14 (8): 3414-3426.
57. Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* 2003 Mar 7; 278 (10): 8597-8605.

Figure Legends

Figure 1 The cytotoxic effects of FTY720 and sphingosine in CLL cells. (a) MEC1 cells were incubated with increasing concentrations of FTY720 (FTY720) during 24, 48 or 72h at 37°C. Cell metabolism was measured by a MTS conversion assay as described in Materials and Methods section. (b) MEC1 cells were treated for 24h at 37°C with FTY720 or sphingosine (Sph) at different concentrations. Cell metabolism was measured as in (a). (c) MEC1 cell were treated for 24 h with increasing amounts of FTY720-P, FTY720, sphingosine kinase inhibitor (SKI), sphingosine-1-P (S1P) or sphingosine in the presence or not of 5µM SKI. Cell viability was assessed with AnnexinV and 7-AAD flow cytometry staining and represented as the percentage of AnnexinV⁺/7-AAD⁻ cells. Data represent the mean ± s.d from two independent experiments performed in duplicate. (d) Primary leukemic B cells purified from 8 CLL patients were treated with 10µM FTY720, 20µM Sphingosine or 1µM staurosporine (STS) for 24 hours at 37°C. Cell viability was assessed as in (c). Bars indicate the mean of data obtained from the individual patient cell samples. * indicates a statistical significance (p<0.01).

Figure 2 FTY720 induces a caspase-independent cell death in CLL cells. (a) MEC1 cells were treated with 10µM FTY720, 10µM FTY720-P, 20µM Sph, 20µM S1P or 1µM STS for 24 h at 37°C. Cells were lysed and proteins were subjected to immunoblot analysis with anti-PARP1 and anti-caspase 3 using ERK2 antibody as a loading control. (b) MEC1 cells incubated with 10µM FTY720 or 20µM Sph for 24h were lysed in caspase buffer and caspase activity was determined as described in Materials and Methods section. Data are the mean ± s.d of quadruplicate determinations. (c) MEC1 cells were treated with 10µM FTY720 or 1µM STS in the presence or not of 20µM QVD-Oph for 24h at 37°C. Cell viability was assessed by Annexin-V/7-AAD staining. Numbers represent the percentage of AnnexinV⁺/7-AAD⁻ cells expressed as the mean ± s.d of three independent determinations. (d) Cells were treated as in (c) and caspase-3 activity was measured by flow cytometry using anti-active caspase 3-FITC staining. Data represent the mean fluorescence intensity (MFI) of active caspase 3 staining from two independent experiments in duplicates (*, p<0.01).

Figure 3 FTY720 leads to autophagolysosome formation and cathepsin activation in CLL cells. (a) MEC1 cells stably transfected with mCherry-LC3 were treated with 10µM FTY720 or 20µM Sph. After 24h at 37°C, nuclei and lysosomes were respectively stained with DAPI and LysoTracker Green for 30 min at 37°C. Cells were then analyzed under a fluorescence microscope. Arrowheads show representative

accumulations of mCherry-LC3 in intracytoplasmic vesicles stained by the LysoTracker dye (left panels). Histograms represent the percentage of cells with mCherry-LC3 positive vesicles counted from >200 cells. Data are expressed as the mean \pm s.d of two independent determinations (*, $p < 0.001$). Scale bar = 5 μ m. (b) MEC1 cells were treated during 24 hours with 10 μ M FTY720, 10 μ M FTY720-P, 20 μ M Sph or 20 μ M S1P. Cell lysates were analysed by immunoblot with anti-LC3 antibody. ERK2 was used as a loading control. (c) Transmission electron microscopy analysis was performed on MEC1 cells treated with 10 μ M FTY720 for 24 hours at 37°C. Micrographs depict large autophagic vacuoles with typical double membrane containing digested materials (arrow). (d) MEC1 cells incubated with 10 μ M FTY720 or 20 μ M Sph for 24h were lysed and cathepsin B and L activity was determined as described in Materials and Methods section. Data are the mean \pm s.d of quadruplicate determinations. (e) Cells were treated with 1 μ M of the cathepsin inhibitor CA074 for 1h at 37°C prior treatment with 10 μ M FTY720 or 20 μ M Sphingosine 24 hours. Cell metabolism was measured by a MTS conversion assay. Data are the mean \pm s.d from two independent experiments performed in triplicates. (f) Cells were incubated with 25nM Bafilomycin or 2.5mM 3-methyladenine (3MA) in the presence of 20 μ M QVD-Oph 1h at 37°C. 10 μ M FTY720 or control vehicle was then added for 24h. Cell metabolism was measured as in (e). Histograms show mean \pm s.d from two independent experiments.

Figure 4 FTY720 and Sphingosine induce necrotic death in MEC1 cells and in primary leukemic cells. (a) MEC1 cells were treated with 10 μ M FTY720, 10 μ M FTY720-P, 20 μ M Sph, 20 μ M S1P, or 1mM H₂O₂ in the presence of 20 μ M QVD-Oph, and with 1 μ M STS in the absence of QVD-Oph overnight at 37°C. Cell necrosis was assessed by AnnexinV and 7-AAD staining and represented as the percentage of AnnexinV⁻/7-AAD⁺ cells. Histograms show the mean \pm s.d of 3 independently performed experiments (*, $p < 0.01$). (b) MEC1 cells were incubated with 10 μ M FTY720 (1, 2), 20 μ M Sph (3), or control vehicle (4) in the presence of 20 μ M QVD-Oph for 16h at 37°C. Cells were then analyzed by electron microscopy analysis and representative images are shown. Ultrastructural features of necrosis include increased cell volume (oncosis), organelles swelling and loss of mitochondrial ultrastructure (arrows), condensation of chromatin into small irregular patches (*), disruption of the plasma cell membrane (arrowhead) and translucent cytoplasm (#). (c) Primary leukemic cells purified from CLL patients were treated during 24 hours with 10 μ M FTY720 in the presence of QVD-Oph or with 1 μ M STS in the absence of QVD-Oph. The percentage of necrotic cells in each conditions was examined by AnnexinV/7-AAD staining (% of AnnexinV⁻/7-AAD⁺ cells). Upper panels show a FACS analysis from one patient sample. Numbers represent the averaged percentage of AnnexinV⁻/7-AAD⁺ cells \pm s.d of 2 independent determinations. Lower histograms display the results obtained from 6 CLL patient samples analyzed in duplicates.

Differences are statistically significant (*, $p=0.03$). (d) MEC1 cells were treated as described in (a). LDH release in the cell culture supernatants was determined as described in the Materials and Methods section. Data are shown as the fold change over control vehicle-treated cells \pm s.d of triplicate determinations.

Figure 5 FTY720 promotes HMGB1 release from CLL cells. (a) MEC1 cells stably transfected with HMGB1-EGFP were treated with 10 μ M FTY720 or 20 μ M Sph for 16h at 37°C. After nucleus staining with DAPI, cells were analyzed with a fluorescence microscope. Arrowheads show representative accumulation of HMGB1-EGFP in the cytoplasm (upper panels). Lower histograms represent the percentage of cells with cytoplasmic HMGB1-EGFP counted from >200 cells. Data are expressed as the mean \pm s.d of two independent determinations (*, $p<0.01$). Scale bar = 10 μ m. (b) MEC1 cells were treated either with DMSO (Ctrl) for 24h or with 10 μ M FTY720 for 6h and 24h at 37°C. Cell extracts were then fractionated and same amounts of nuclear and cytoplasmic protein extracts were immunoblotted with antibodies against HMGB1, tubulin and nucleoporin. (c) HMGB1-EGFP transfected MEC1 cells were treated with DMSO (Ctrl), 10 μ M FTY720 or FTY720-P, 20 μ M Sph or S1P, 5 μ M BAY61-3606 (Syk inh.) or 1 μ M STS for 24 h at 37°C. Cell culture supernatants were collected and equal amounts of extracellular proteins from each condition were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Following staining with Ponceau solution, membranes were immunoblotted with antibodies against EGFP and fibronectin.

Figure 6 FTY720 causes cell death independently of RIPK1 and PP2A in MEC1 cells. (a) MEC1 and U937 cells were incubated with 20 μ M necrostatin-1 (Nec-1) for 1h at 37°C. MEC1 cells were then left untreated or treated with 10 μ M FTY720 with and 20 μ M QVD-Oph or 1 μ M STS, whereas U937 were untreated or treated with 10ng/ml TNF α for 48h at 37°C. Cell metabolism was measured by a MTS conversion assay. Data represent the mean \pm s.d of three independent determinations. (b) MEC1 cells were treated with the indicated doses of okadaic acid (OA) in the presence or not of 20 μ M QVD-OPH. Cells were then either left untreated or treated with 10 μ M FTY720 for 24h and cell metabolism was determined as in (a).

Figure 7 CLL cell necrosis induced by FTY720 is DRP1-dependent. (a) MEC1 cells were treated during 0, 15, 30 and 120 min with 10 μ M FTY720. Cell extracts were fractionated and same amounts of membrane/organelle and cytoplasmic protein extracts were immunoblotted with antibodies against total DRP1, tubulin and VDAC-1 or phosphorylated forms of DRP1, p38, ERK1/2, JNK, and AKT. (b) Membrane/organelle protein extracts were prepared from MEC1 cells treated with 10 μ M of FTY720 for the indicated times at 37°C. Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE under non reducing conditions and immunoblotted with antibodies against DRP1 and the mitochondrial protein SMAC as loading control. (c) MEC1 cells transfected with EGFP-DRP1 for 4 h in the presence of QVD-OPH were treated or not with 10 μ M FTY720 for 2 h at 37°C. After mitochondria staining with Mitotracker Red, cells were imaged with confocal microscopy. Arrowheads show representative accumulation of EGFP-DRP1 at the mitochondria (left panels). Right histograms represent the percentage of cells with mitochondrial EGFP-DRP1 counted from >30 EGFP+ cells. Data are expressed as the mean \pm s.d of 6 independent fields (*, $p < 0.05$). Scale bar = 5 μ m. (d) MEC1 cells were transfected with plasmids encoding EGFP or EGFP-DRP1 overnight at 37°C. Cells were then incubated with or without 10 μ M FTY720 in the presence of 20 μ M QVD. Cell viability was assessed by Annexin-V/7-AAD staining. Histograms represent the mean \pm s.d from 2 independent experiments. Control immunoblots (right panels) show the expression of EGFP-DRP1 in transfected cells. (e) MEC1 cells were transfected with luciferase siRNA (siCtrl) and DRP1 siRNA (siDRP1) overnight at 37°C. Cells were then treated with 10 μ M FTY720 in the presence of QVD-OPH for 24h and cell viability was analyzed as in (c). Data are mean \pm s.d from 2 independent experiments (*, $p < 0.01$). Lysates from transfected cells MEC1 were immunoblotted with DRP1 and tubulin antibodies (right panels).

Figure 8 FTY720-induced cell death involves early ROS production and PGAM5 expression. (a) Cells were labeled with 5 μ M carboxy-H2DCFDA in serum-free RPMI for 30 min at 37°C, then washed and incubated with 10 μ M FTY720, 20 μ M Sph or 1 μ M H202 for 60 min at 37°C in culture medium containing QVD-OPH. ROS production was then analyzed by flow cytometry in the presence of trypan blue (0.0025% w/v). Data represent the mean \pm s.d of two independent determinations. (b) MEC1 cells were transfected with luciferase siRNA (siCtrl) and PGAM5 siRNA (siDRP1) overnight at 37°C. Cells were then treated with 10 μ M FTY720 in the presence of QVD-OPH for 24h and cell viability was analyzed by Annexin-V/7-AAD staining. Data are mean \pm s.d from 2 independent experiments. Lysates from MEC1 cells transfected with non-silencing (Ctrl) or PGAM5 siRNAs were immunoblotted with PGAM5 and tubulin antibodies (right panels). (c) Model of DRP1-dependent necrotic cell death induced by FTY720

and sphingosine in CLL cells. LMP: lysosomal membrane permeabilization; ROS: reactive oxygen species; PGAM5: phosphoglycerate mutase family member 5.

Figure 1

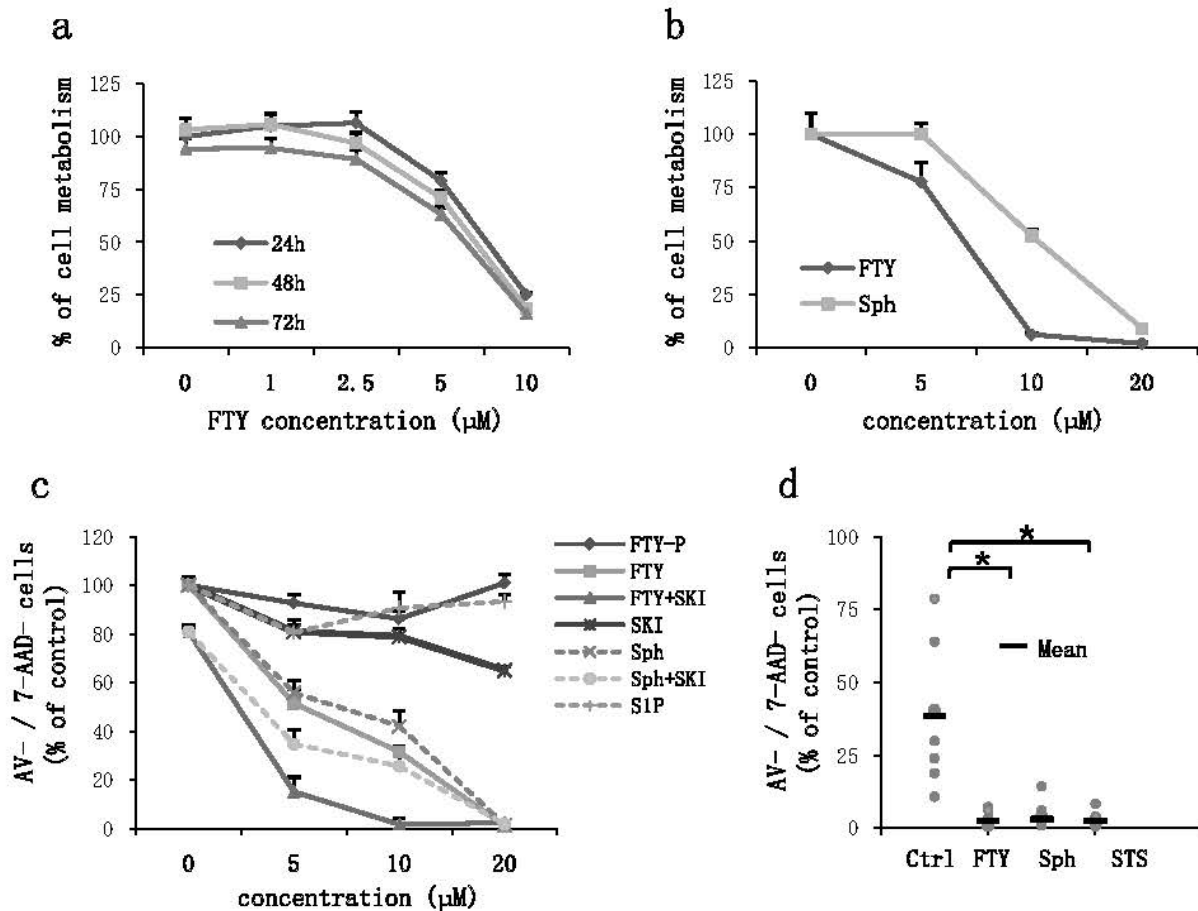


Figure 2

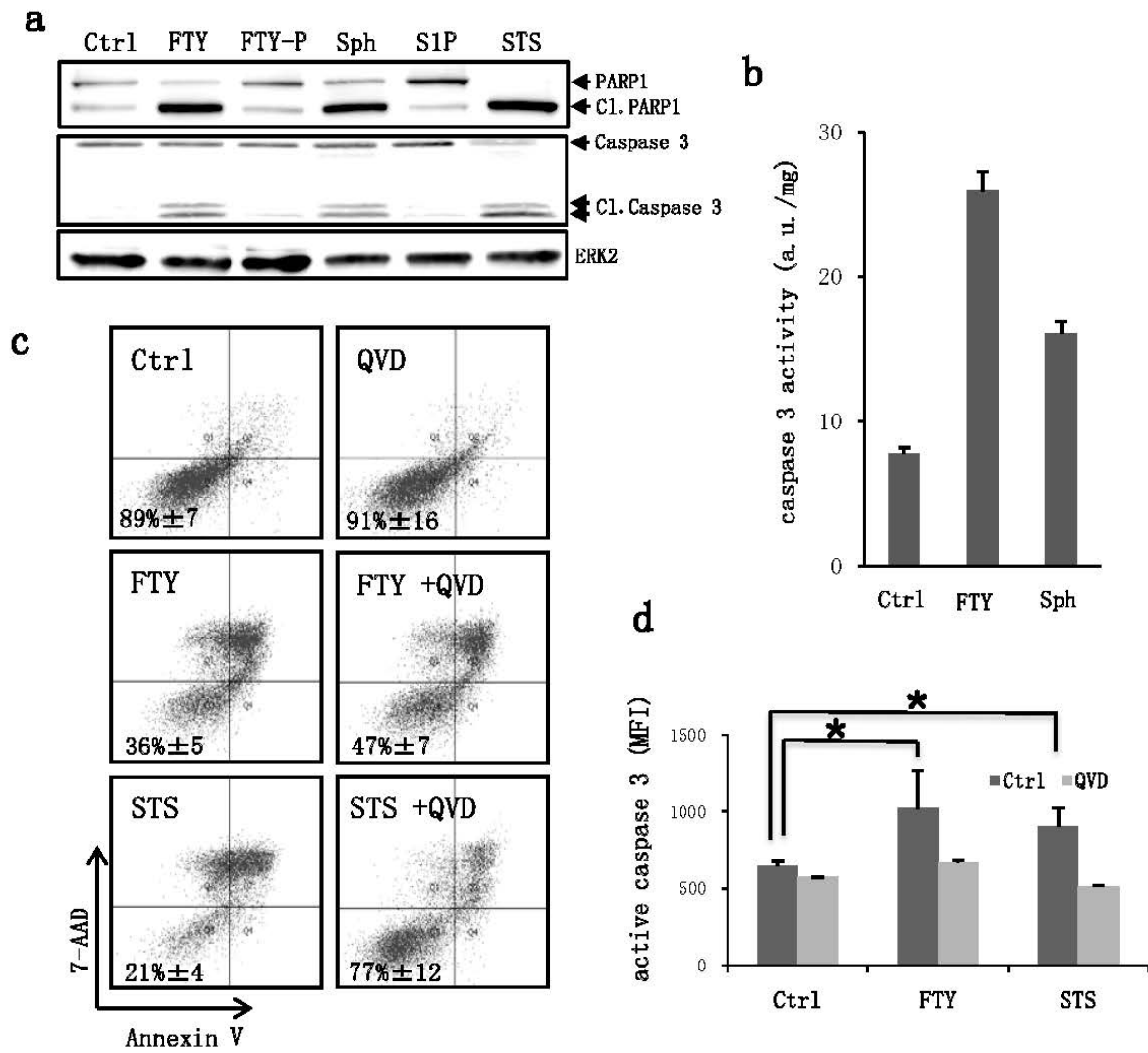


Figure 3

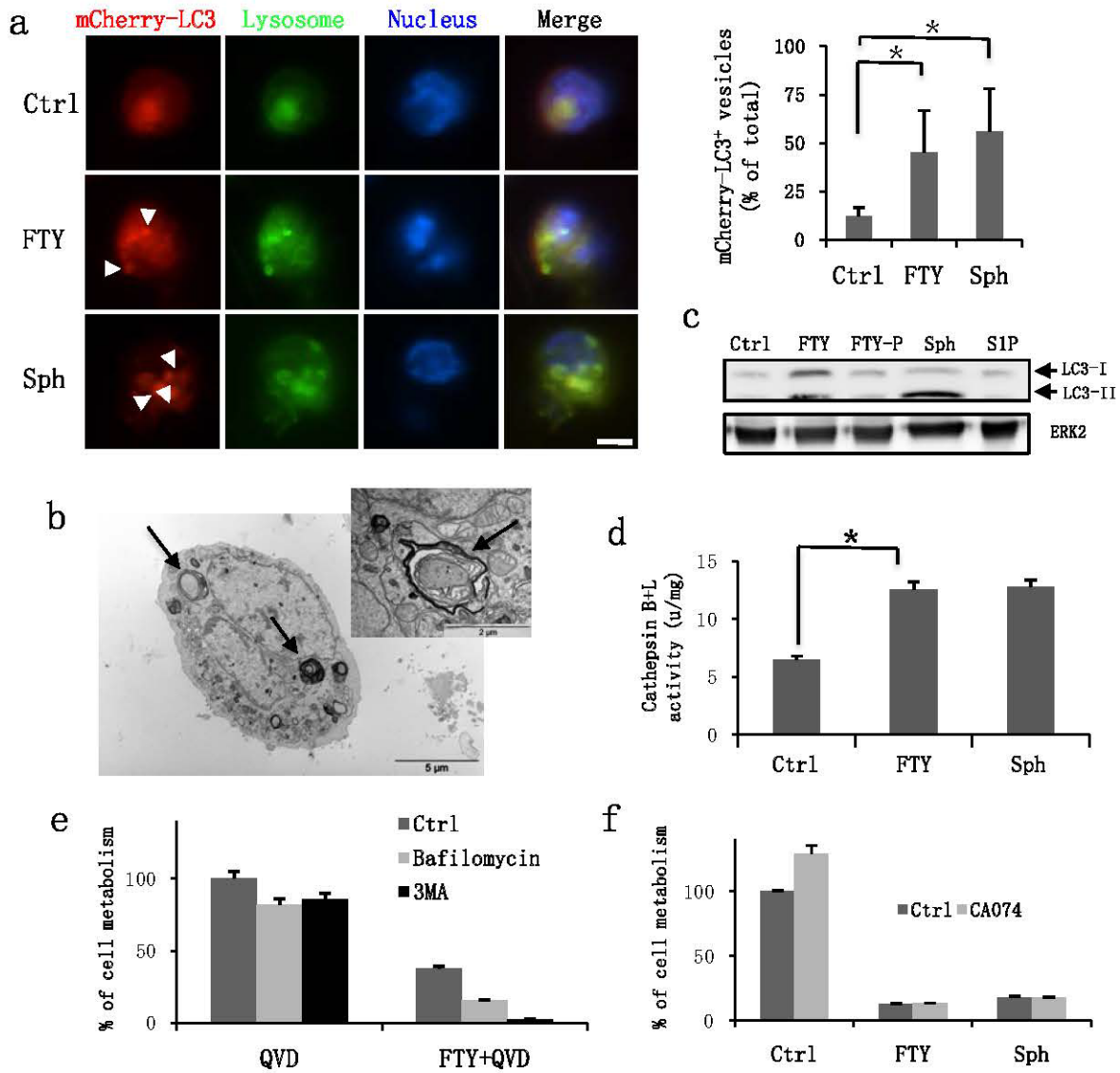


Figure 4

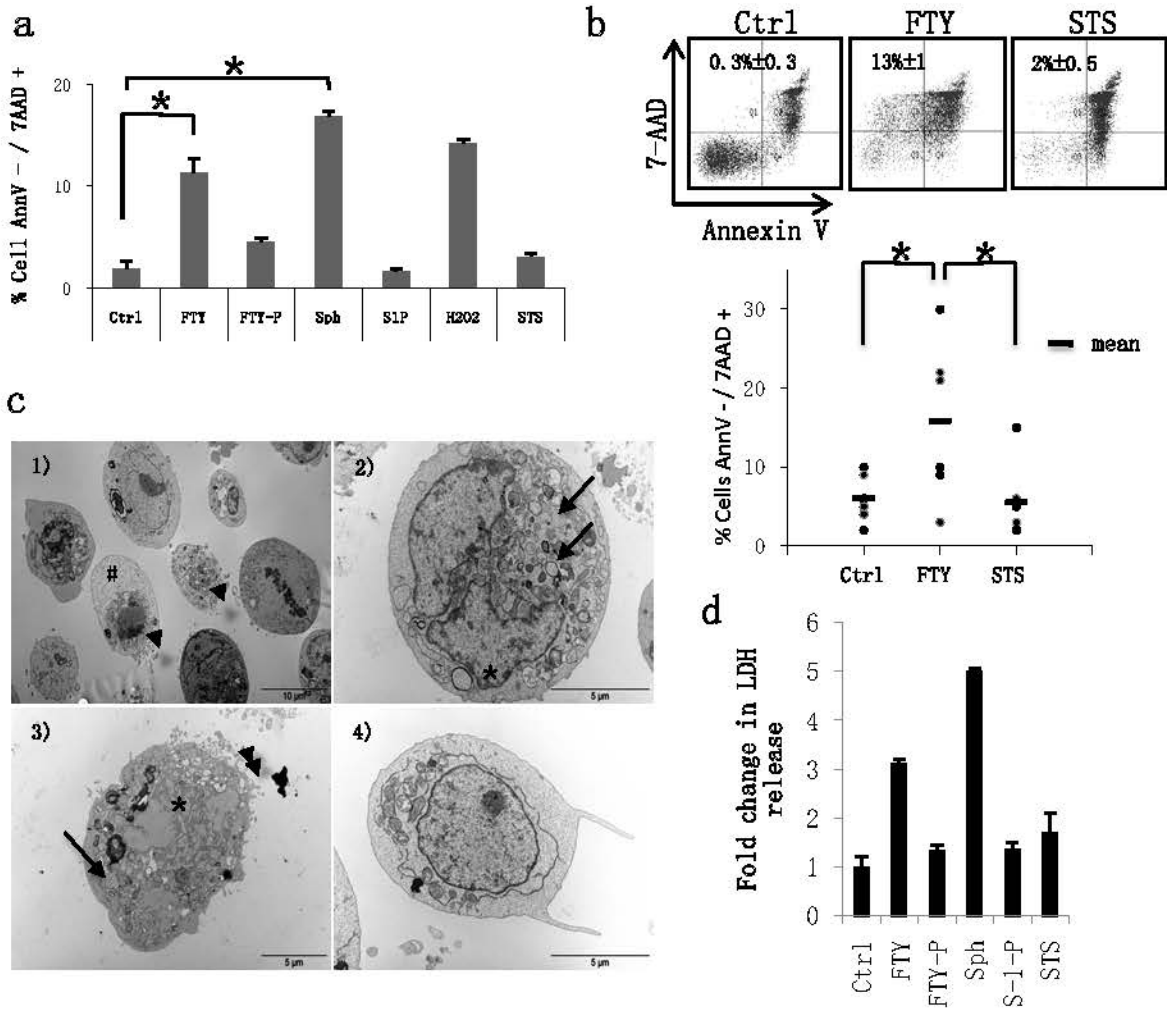


Figure 5

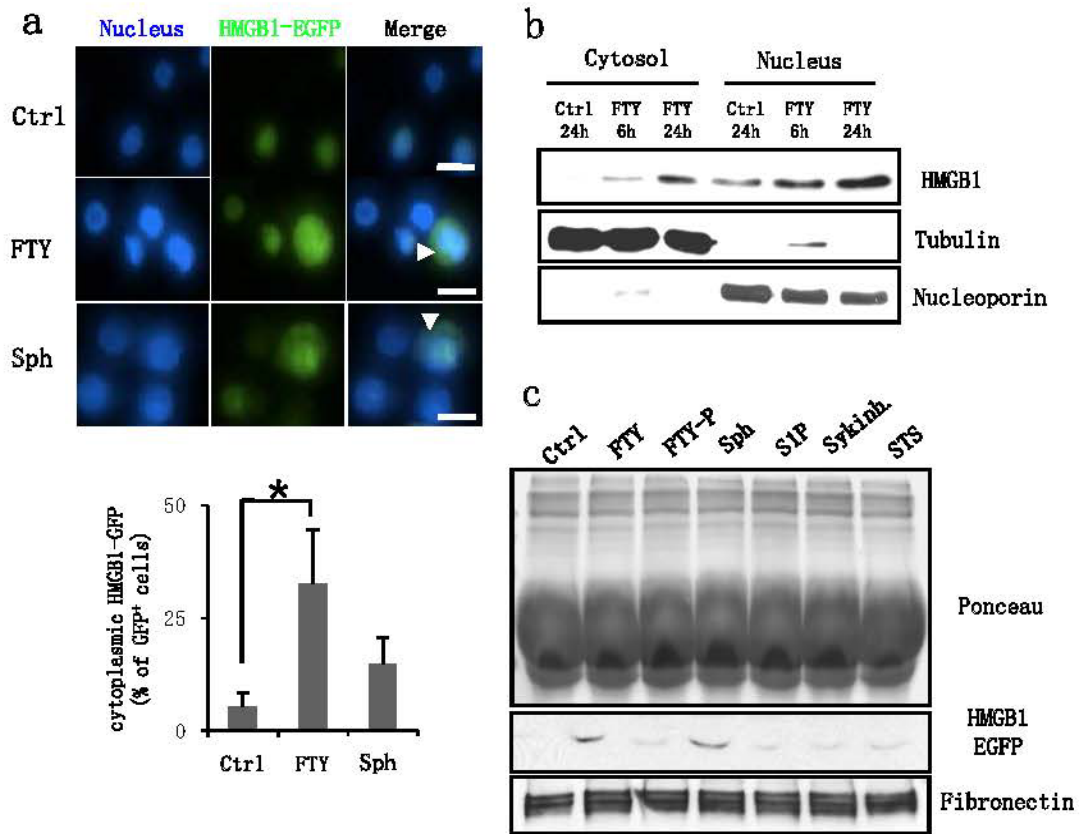


Figure 6

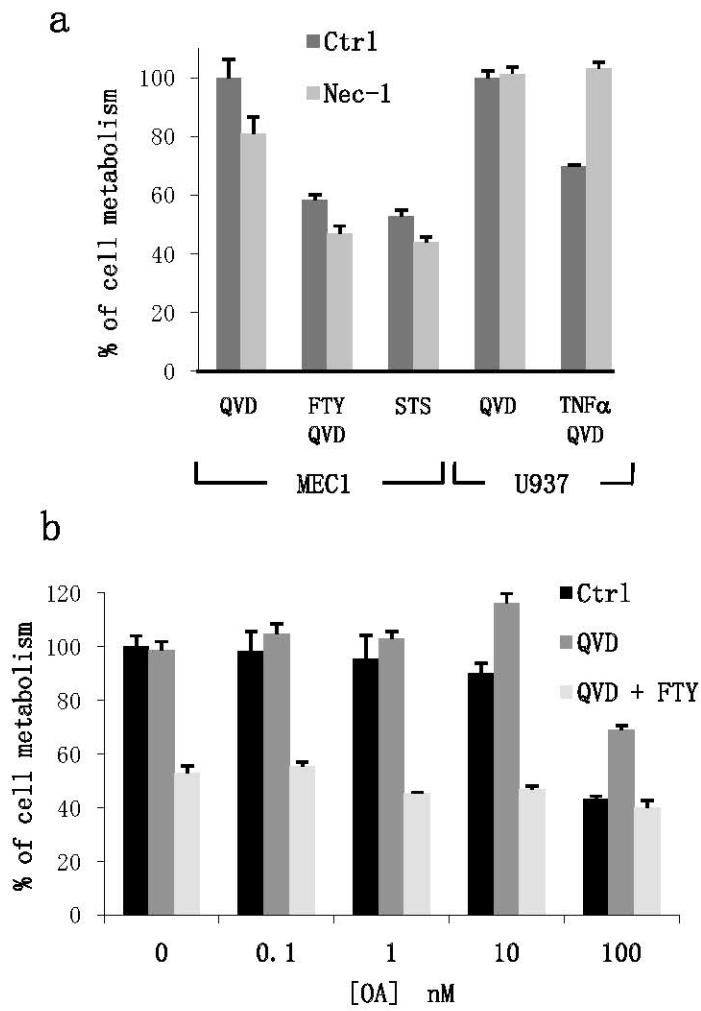


Figure 7

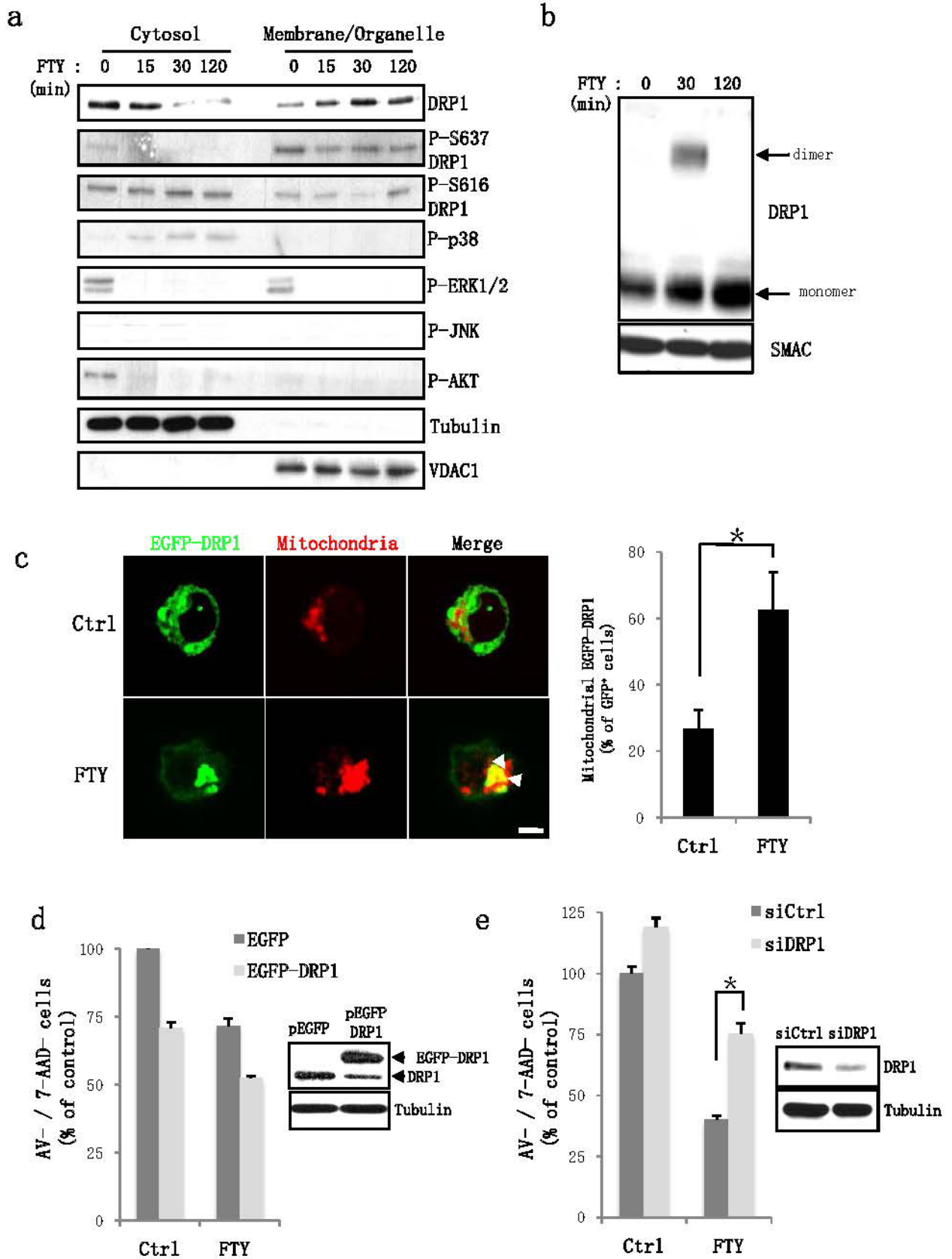
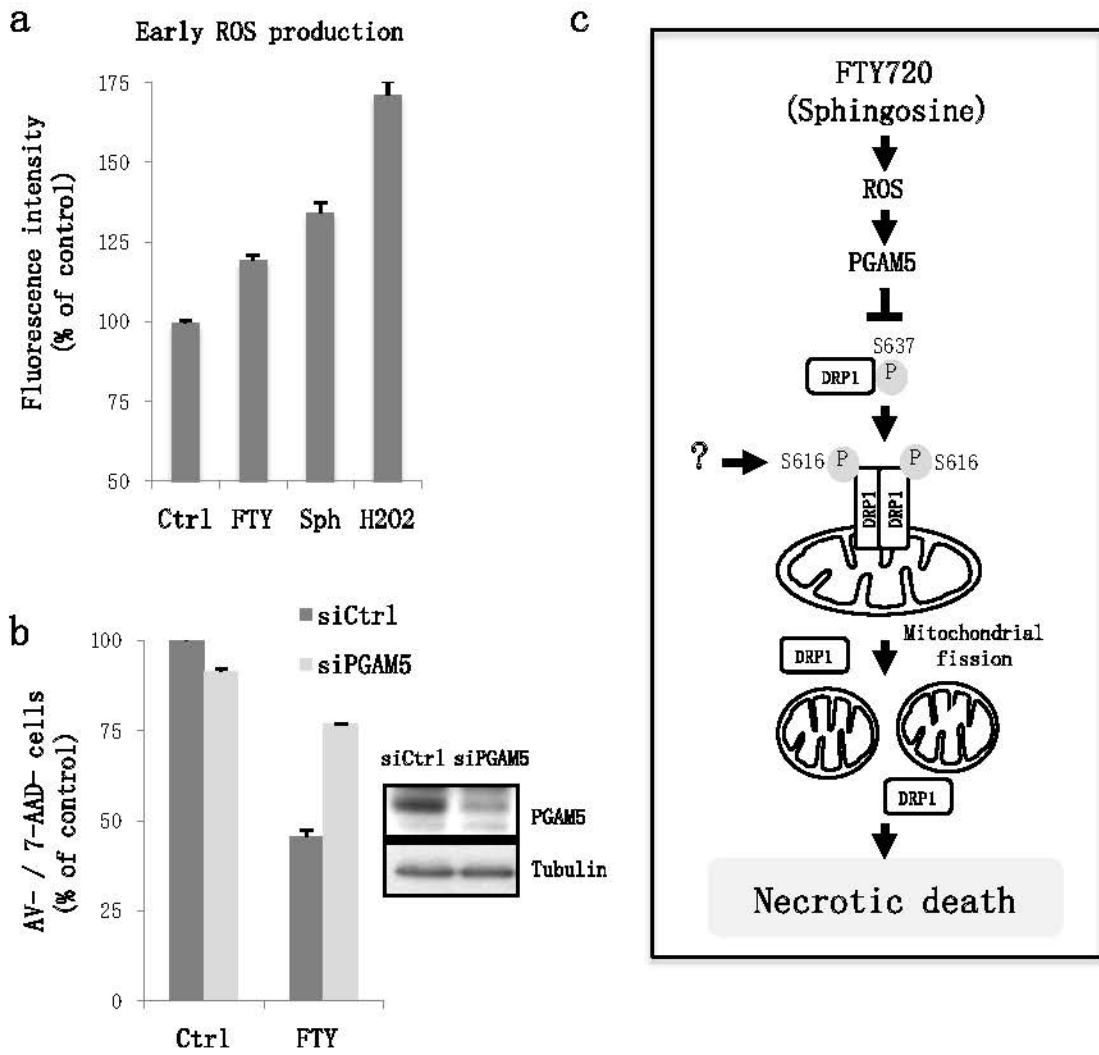


Figure 8



Discussion

Le fingolimod ou FTY720 est utilisé comme immunosuppresseur dans la sclérose en plaques (Kappos et al., 2010; Khatri et al., 2011). Son action immunosuppressive est médiée par la forme phosphorylée du FTY720 qui se lie au récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P) ou S1PR (Brinkmann et al., 2010) et les inactivent en provoquant leur internalisation. L'interaction entre FTY720 phosphorylé et le S1PR des lymphocytes va entraîner une séquestration des lymphocytes T naïfs et centraux-mémoire dans les organes lymphoïdes secondaires et diminuer la synthèse d'interleukine. L'interaction entre FTY720 phosphorylé et S1PR joue également un rôle dans la restauration de la barrière hémato-méningée et dans la remyélinisation médiée par les oligodendrocytes (Mehling et al., 2011).

Le FTY720 peut également induire un effet cytotoxique sur des cellules néoplasiques, s'il est utilisé à des doses supérieures à son action immunosuppressive (Liu et al., 2008; Saddoughi et al., 2013; Wallington-Beddoe et al., 2011; Zhang et al., 2010a). Le fingolimod peut donc être également envisagé dans les traitements anticancéreux. En effet de fortes doses de FTY720 (10mg/kg/jour), injectées à des souris, montrent une action anti-néoplasique sans pour autant induire de mortalité chez l'animal (Neviani et al., 2007; Saddoughi et al., 2013). En revanche l'effet cytotoxique du FTY720 n'est pas médié par l'interaction de sa forme phosphorylée sur les S1PR. Le FTY-phosphate n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules MEC1 (Figure 1). Il n'entraîne pas de clivage de caspase 3 (Figure 2), n'augmente pas le flux autophagique (Figure 3), et n'induit pas de perméabilisation des membranes plasmiques et de libération de LDH (Figure 4). Les sphingosine kinases phosphorylent le FTY720 en FTY-phosphate. Les inhibiteurs des sphingosine kinases (SKI) empêchent la synthèse de FTY-phosphate et augmentent la cytotoxicité du FTY720 (Figure 1). L'absence de cytotoxicité induite par le FTY-phosphate a déjà été décrite dans un modèle de leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Liu et al., 2008), de leucémie myéloïde chronique, de leucémie lymphoïde aiguë (Neviani et al., 2007), de cancer de la prostate (Pchejetski et al., 2010), et dans les cancers du poumon (Saddoughi et al., 2013). Seules deux publications rapportent une action anti-tumorale du FTY-phosphate par son action contre la néo-angiogénèse tumorale secondaire à l'inhibition de l'autotaxine (van Meeteren et al., 2008) et des S1PR des cellules endothéliales (LaMontagne et al., 2006).

L'effet anti-tumoral du FTY720 est bien connu, mais les mécanismes de sa cytotoxicité restent incertains (Pitman et al., 2012). De nombreuses études indiquent que l'effet du FTY720 est spécifique du type cellulaire. Son mécanisme est caspase-dépendant dans les cellules MCF7 du cancer du sein et dans les cellules hépatiques Huh7 (Azuma et al., 2002; Hung et al., 2008). Nos résultats montrent que le FTY720 induit l'expression de marqueurs classiques de l'apoptose dans notre modèle de LLC : clivage de PARP1 et de caspase 3, augmentation de l'activité catalytique de caspase 3 et exposition de la phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique (Figure 2). Toutefois, l'utilisation d'un inhibiteur pan-caspase n'inhibe pas l'effet cytotoxique du FTY720 sur les cellules MEC1 et l'examen par la microscopie électronique ne montre pas d'altération morphologique compatible avec une apoptose. Nos observations suggèrent ainsi un mécanisme caspase-indépendant comme cela a déjà été décrit dans la

LLC (Liu et al., 2008), dans la leucémie aiguë lymphoïde (Wallington-Beddoe et al., 2011), d'autres pathologies hématopoïétiques (Liu et al., 2008) et dans des tumeurs ovariennes (Zhang et al., 2010a).

Dans notre modèle, tout comme dans d'autres cancers (Wallington-Beddoe et al., 2011; Zhang et al., 2010a), le FTY720 augmente le flux autophagique. Il accroît la lipidation de LC3 et la formation d'autophagosome (Figure 3). Le FTY720 induit une autophagie mais il ne provoque pas une mort cellulaire par autophagie (Galluzzi et al., 2012). En effet, l'inhibition de l'autophagie, ne modifie pas la cytotoxicité du FTY720 (Figure 3) et montre plutôt une aggravation de son effet cytotoxique lorsque l'autophagie est inhibée. L'autophagie est un mécanisme de dégradation lysosomale indispensable à l'homéostasie, la différenciation et la survie cellulaire. Elle permet une adaptation face à différents stress cellulaires, comprenant les infections, les néoplasies, les processus dégénératifs et les stress oxydatifs (Das et al., 2012). Parfois, le caractère pro-survie de l'autophagie peut être délétère comme dans certaines cellules cancéreuses dont elle favorise la survie et la résistance aux chimiothérapies (Galluzzi et al., 2012). Dans la LLC, l'autophagie causée par le FTY720 semble avoir un rôle protecteur visant à aider la cellule à se défendre face à l'effet cytotoxique du FTY720. Ceci est supporté par une rapide phosphorylation de la MAPK p38, une kinase impliquée dans la réponse au stress, après stimulation par le FTY720. Mais cette autophagie ne s'avère pas suffisante pour contrer la toxicité du FTY720. De plus, l'activation d'effecteurs des caspases pourrait être la conséquence du relargage des cathepsins B et L, un groupe de protéases lysosomales à cystéine reliées à l'activation de la voie de signalisation de l'apoptose mitochondriale (Cesen et al., 2012; Kirkegaard and Jaattela, 2009). D'ailleurs, la conversion de la sphingomyéline en sphingosine est un important déclencheur d'apoptose lysosomale et de la perméabilisation membranaire lysosomale (LMP) (Cesen et al., 2012; Ullio et al., 2012).

L'effet du FTY720 dans la LLC n'étant ni une mort apoptotique, ni une mort autophagique, nos observations tendent à montrer qu'il s'agit d'une mort cellulaire par nécrose. La nécrose a été longtemps considérée comme une mort passive et non régulée (Vandenabeele et al., 2010). L'induction d'une mort nécrotique par le FTY720 a déjà été décrites dans les tumeurs ovariennes (Zhang et al., 2010a) et le cancer du poumon (Saddoughi et al., 2013). Nos travaux montrent que le FTY720 induit l'apparition de marqueurs de la nécrose. L'analyse en microscopie électronique confirme la morphologie caractéristique de nécrose cellulaire des cellules MEC1 traitées par FTY720 (Figure 4) : altérations des mitochondries et des membranes plasmiques, ballonnement cellulaire et condensation de la chromatine en amas irréguliers. La perméabilisation des membranes plasmiques (PMP) et nucléaire est objectivée par le marquage 7AAD en cytométrie de flux (Figure 4), l'augmentation du taux de LDH (Figure 4) et la relocalisation d'HMGB1 dans le cytoplasme et dans le milieu extra-cellulaire (Figure 5). L'augmentation des cathepsines est en faveur d'une LMP.

La nécrose cellulaire a longtemps été considérée comme un phénomène non spécifique, incontrôlable et non régulé. On sait aujourd'hui qu'il existe bien des nécroses cellulaires programmées (Kaczmarek et al., 2013; Vandenabeele et al., 2010). La voie de nécrose régulée la mieux connue est celle du TNFR-1 (récepteur 1 au tumor necrosis factor). La liaison du TNF α à son récepteur TNFR-1 conduit en fonction du type cellulaire et du microenvironnement à une survie, une apoptose ou à une nécrose cellulaire. Lorsque la caspase 8 est inactivée, l'interaction du TNF α et de son récepteur entraîne une phosphorylation de RIPK1 et RIPK3 (receptor interacting protein kinase 1 et 3) et une mort cellulaire par

nécrose programmée (Galluzzi et al., 2012). La nécrose induit une dégradation active des mitochondries médiée par DRP1 (dynamin related protein 1) (Wang et al., 2012). Les mitochondries sont des organelles interconnectées. Elles subissent en permanence des changements dynamiques de fusion et fission en fonction des modifications physiologiques ou pathologiques de l'environnement cellulaire. Chez les mammifères, la fusion mitochondriale est sous la dépendance des protéines mitofusine et OPA1 (optic atrophy 1) tandis que la fission mitochondriale est contrôlée par DRP1 (Otera and Mihara, 2011). Pendant la nécrose cellulaire, DRP1 se relocalise du cytoplasme à la membrane mitochondriale. DRP1 provoque une fragmentation des mitochondries et une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui dissipe le potentiel membranaire mitochondrial, entraîne la génération de réactive oxygen species (ROS) et une déplétion en ATP. Le niveau d'expression des ARNm de DRP1 est corrélé à la susceptibilité des lymphocytes B à subir une nécrose programmée (Bras et al., 2007). L'activité de DRP1 est étroitement contrôlée par ubiquitination, sumoylation et phosphorylation (Knott and Bossy-Wetzel, 2008).

De récentes études ont montré que la cytotoxicité du FTY720 est dépendante de la protéine phosphatase 2A (PP2A) dans des tumeurs pulmonaires (Saddoughi et al., 2013) et dans des hémopathies (Neviani et al., 2007; Oaks et al., 2013). Le FTY720 et les céramides activent PP2A en se liant directement à son inhibiteur, I2PP2A/SET, ce qui augmente l'activité phosphatase de PP2A (Ogretmen and Hannun, 2004; Saddoughi et al., 2013). PP2A activé peut alors déphosphoryler DRP1 sur la sérine 656 ce qui conduit à une fragmentation mitochondriale (Dickey and Strack, 2011). L'acide okadaïque est un inhibiteur de PP2A, certaines études montrent qu'il inhibe l'effet cytotoxique du FTY720 (Liu et al., 2008; Neviani et al., 2007; Saddoughi et al., 2013). Cependant, nos résultats ne montrent aucun effet de l'acide okadaïque sur la mort induite par le FTY720 dans les cellules de LLC MEC1. Même si la raison de cet échappement à l'activation de PP2A est encore inconnue, elle a été décrite dans d'autres cancers tels la leucémie lymphoblastique aiguë (Wallington-Beddoe et al., 2011) et les carcinomes ovariens (Zhang et al., 2010a) ou hépatocytaires (Hung et al., 2008). D'un autre côté l'activation de la nécrose par les récepteurs CD95, TNFR1 ou TRAILR1 et 2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors) est médiée par les protéines RIPK1 et RIPK3. Dans ce contexte, nos résultats ont montré que l'effet du FTY720 dans la LLC est RIPK1-indépendant car l'utilisation de la Necrostatin-1, un inhibiteur hautement spécifique de RIPK1, ne parvient pas à inhiber la mort entraînée par le FTY720 (figure 6). Une explication à ceci pourrait provenir de l'incapacité des cellules de la LLC à former un complexe « Ripoptosome » fonctionnel comme décrit récemment (Maas et al., 2013).

Une autre hypothèse pour expliquer le déclenchement de la nécrose par le FTY720 est l'activation de DRP1 par le FTY720 via la génération de ROS et l'action de PGAM5 (mitochondrial protein phosphatase phosphoglycerate mutase/protein phosphatase 5). En effet, le FTY720 est un analogue de la sphingosine qui peut être transformé en céramide par les céramide-synthases. La sphingosine peut provoquer une perméabilisation de la membrane lysosomale et la libération des protéases lysosomales (dont des cathepsines) dans le cytosol entraînant une génération de ROS (Kagedal et al., 2001). Il a déjà été démontré que le FTY720 induisait une production de ROS dans des tumeurs hépatiques (Hung et al., 2008) et dans des hémopathies malignes (Liu et al., 2010; Wallington-Beddoe et al., 2011). Les ROS entraînent un cercle vicieux de dommages cellulaires accompagnés d'altérations mitochondriales et de

peroxydation des lipides membranaires (Vandenabeele et al., 2010). La céramide C16 et la sphingosine ont démontré un pouvoir d'inhibition de l'activité du complexe IV de mitochondries isolées (Cesen et al., 2012). On peut penser que le FTY720 affecte les chaînes respiratoires mitochondriales dans la LLC. Ce processus va générer des ROS qui vont activer PGAM5 via Keap-1 (Lo and Hannink, 2008), une protéine sensible aux variations du potentiel redox cellulaire. PGAM5 est une enzyme clé de la voie intrinsèque de nécrose cellulaire programmée. Elle se lie au nécrosome dans une atmosphère hydrophobe, probablement au site de fission mitochondriale où est localisée DRP1. PGAM5 déphosphoryle DRP1 sur la sérine 637, augmente son activité GTPase et stabilise sa localisation sur la membrane mitochondriale (Wang et al., 2012). L'activité de DRP1 est en effet régulée par des modifications post-traductionnelles dont sa phosphorylation réversible sur plusieurs sites (Westermann, 2010). Parmi ses phosphorylations, la phosphorylation sur la sérine 637 par la PKA (cyclic AMP-dependent kinase) va inhiber l'activité de fission mitochondriale de DRP1 (Chang and Blackstone, 2007; Cribbs and Strack, 2007). Nos travaux montrent que le traitement au FTY720 dans la LLC s'accompagne d'une déphosphorylation de DRP1 en sérine 637 (Figure 7). Egalement, l'extinction de PGAM5 et de DRP1 permettent de prévenir significativement les effets cytotoxiques du FTY720 (Figure 8 et 7), alors que la surexpression de DRP1 augmente drastiquement la mort cellulaire (Figure 7). Ces résultats démontrent ainsi que l'action du FTY720 déclenche une nécrose dépendante de DRP1 et passant par l'activation des ROS et de PGAM5 (Figure 26).

La plupart des chimiothérapies anticancéreuses provoquent une mort apoptotique caspase-dépendante. Les récives tumorales et les résistances aux chimiothérapies sont secondaires à la disparition des voies de signalisation conduisant à l'apoptose dans les cellules tumorales. Le principal facteur de mauvais pronostic dans la LLC est la perte de l'expression de p53, qui rend les cellules tumorales résistantes à l'action de la fludarabine (Zenz et al., 2012). p53 est un facteur de transcription qui active en outre, la protéine BAX qui est responsable d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale point clé de l'apoptose (Harris and Levine, 2005). Il est donc nécessaire de développer des drogues anticancéreuses entraînant d'autres morts cellulaires que l'apoptose. Dans ce contexte, le FTY720 qui provoque une nécrose cellulaire programmée dans les cellules de LLC pourrait être prometteur dans le traitement des LLC résistantes aux chimiothérapies conventionnelles (Liu et al., 2008).

Le FTY720 a un effet cytotoxique dans les hémopathies, mais également un effet immunosuppresseur par séquestration des lymphocytes T. Ces deux propriétés pourraient le faire indiquer dans les manifestations auto-immunes des hémopathies. En effet, les hémopathies s'accompagnent d'un dysfonctionnement des lymphocytes T-régulateurs qui favorise l'émergence de maladies auto-immunes (D'Arena et al., 2012). Le Rituximab est couramment utilisé dans cette indication avec une bonne efficacité. Il peut cependant être pris en défaut comme dans les neuropathies à anticorps anti-MAG où son action est retardée et objectivée chez seulement 50% des patients traités (Delmont et al., 2011).

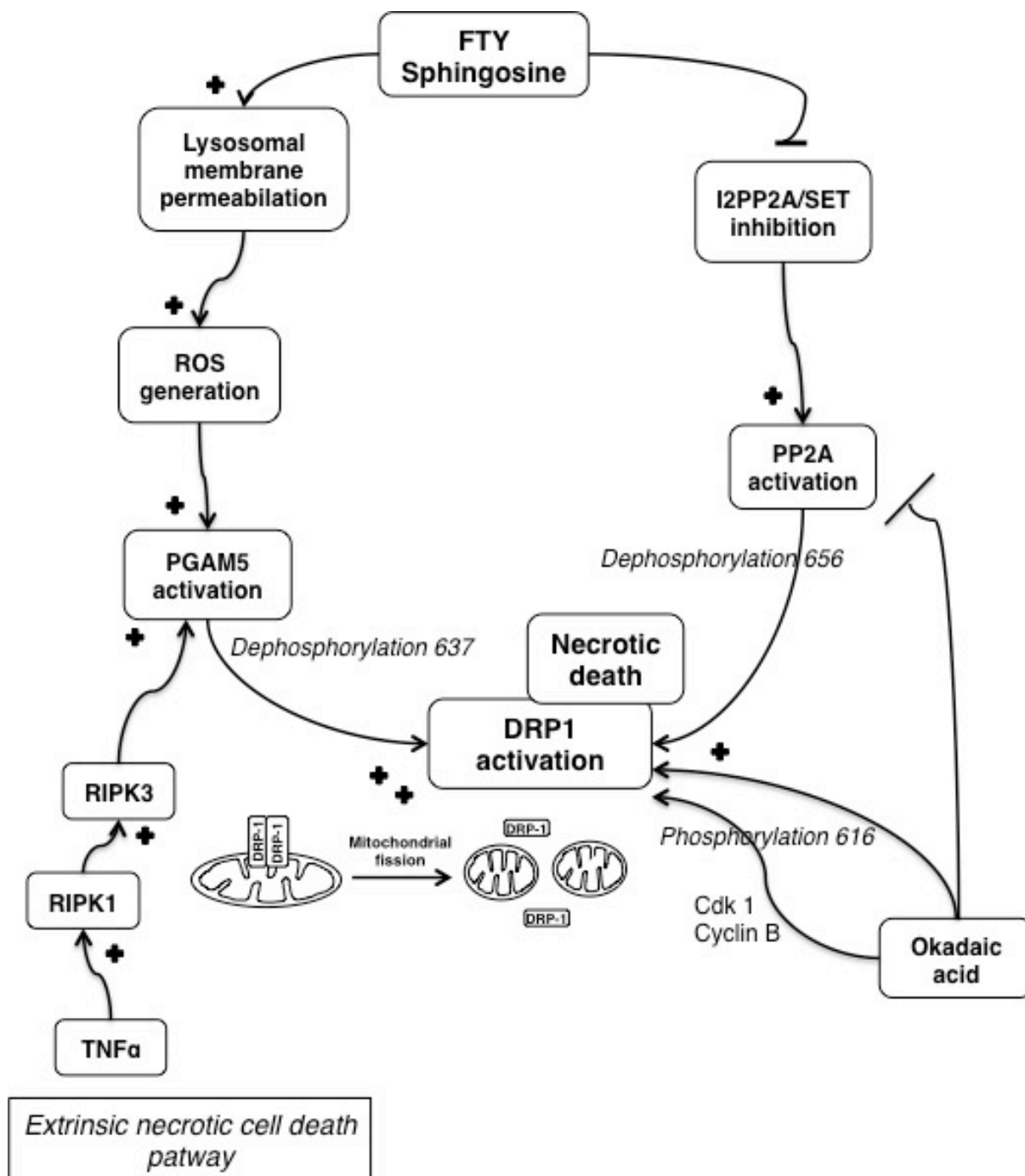


Figure 26 : Mécanismes d'activation de DRP1 par le FTY720 et la sphingosine

Discussion générale

Dans les lymphomes non hodgkiniens (LNH) à cellules B matures, de nombreuses mutations génétiques et épigénétiques altèrent les voies de signalisation impliquées dans la différenciation, la prolifération, la migration et la survie des cellules cancéreuses. Ainsi, il n'est pas rare d'observer dans ces pathologies des modifications des voies de signalisation de p53, Wnt, NF- κ B et PI3K/AKT (Gasparini et al., 2014; Ge and Wang, 2010; Hsi, 2012; Rossi et al., 2013; Zenz et al., 2008; Zhang and Kipps, 2014). A côté de ces modifications intrinsèques à la cellule maligne, il est reconnu que les signaux du microenvironnement tumoral et de la voie du BCR commune à toutes les formes de lymphopathie à cellules B matures jouent un rôle essentiel dans le développement et la progression cellulaire des LNH. La coopération entre ces différents mécanismes est aussi impliquée dans l'échappement tumoral et la résistance aux thérapies conventionnelles et ciblées (Burger, 2011; Burger et al., 2009a; Coupland, 2011; Fowler and Davis, 2013; ten Hacken and Burger, 2014; Young and Staudt, 2013). Une caractéristique majeure des LNH à cellules B matures est une résistance exacerbée à la mort cellulaire, phénomène qui participe à l'agressivité des cellules B cancéreuses et à leur résistance thérapeutique (Mojsa et al., 2014; Scarfo and Ghia, 2013; Shain and Tao, 2014; ten Hacken and Burger, 2014). L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de déclencher la mort des cellules malignes nécessite toutefois une meilleure compréhension des signaux extracellulaires qui vont favoriser l'inhibition de la mort cellulaire, mais également l'identification de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de ce processus.

A ce titre, le métabolisme des sphingolipides, dont la sphingosine et les céramides sont les acteurs essentiels, ont une puissante action régulatrice sur les mécanismes de mort cellulaire. Par exemple, CD95L (Fas ligand) induit une augmentation du taux endogène de céramides entraînant une apoptose dépendante de caspase 9 (Lafont et al., 2012). Les céramides favorisent la mort cellulaire en modulant différentes voies de signalisation cellulaire dont PKC, PP1, JNK (Pitson et al., 2011). Ils interviennent aussi dans les mécanismes de mort en formant des macro-domaines dans la membrane mitochondriale externe au niveau desquels se polymérisent des protéines Bax pour créer des pores et une perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP) (Lee et al., 2011). Dans les hémopathies malignes, les céramides inhibent la phosphorylation de BCL-2 à travers l'activation de PP2A (Protein phosphatase 2A), ce qui conduit à une liaison entre p53 et BCL-2 et une mort par apoptose (Deng et al., 2009). De plus, la stimulation du BCR entraîne une résistance à l'apoptose déclenchée par des inhibiteurs de PI3K et de BTK en augmentant la glucosylation des céramides qui perdent ainsi leur potentiel pro-apoptotique (Schwamb et al., 2012). Le métabolisme des sphingolipides est donc impliqué dans l'apoptose intrinsèque et extrinsèque dépendante des mitochondries. Par ailleurs, les sphingolipides peuvent également déclencher des morts cellulaires indépendantes des caspases (Kagedal et al., 2001), mais dépendante des mitochondries comme le montrent nos travaux sur l'effet cytotoxique du FTY720, un analogue de la sphingosine (confère article II).

Ces dernières années l'intérêt du ciblage du système ubiquitine-protéasome (UPS) a été mis en évidence dans les hémopathies malignes. Le ciblage de l'UPS est illustré en cancérologie par l'utilisation de l'inhibiteur du protéasome bortézomib dans le traitement des hémopathies malignes et en particulier

dans le traitement du myélome multiple (Caravita et al., 2006; Rajkumar et al., 2005). La dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome est un mécanisme finement régulé par les enzymes d'ubiquitination et de déubiquitination. Ces enzymes vont participer à la régulation, la stabilisation ou la dégradation de nombreuses protéines des voies de signalisation de p53, Wnt, NF- κ B, PI3K ou du BCR (confère chapitre IV). En particulier, les membres de la famille BCL-2 sont très sensibles à la dégradation par le protéasome. La dégradation de BCL-2 ou des membres de cette famille tels MCL-1, très présents dans les hémopathies malignes, va entraîner une mort par apoptose (Mojsa et al., 2014; Scarfo and Ghia, 2013). A l'inverse, l'inhibition complète du protéasome va également entraîner l'accumulation des membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (BAX, BAK, BAD, BIM, BIK et BID) et conduire à une augmentation de l'apoptose cellulaire (Li and Dou, 2000; Naujokat and Hoffmann, 2002). Ainsi le ciblage des E3 ligases ou des enzymes de déubiquitination (DUBs) capable de réguler ces protéines et leur dégradation au protéasome est une stratégie novatrice et d'intérêt pour le traitement des hémopathies lymphoïdes malignes (Crawford and Irvine, 2013).

Les morts cellulaires déclenchées par la voie des sphingolipides ou le système ubiquitine-protéasome impliquent très fréquemment la mitochondrie et les membres de la famille BCL-2. Ces deux approches, bien que distinctes, se recoupent dans certains de leurs mécanismes. Ainsi, la MOMP déclenchée par les céramides, entraîne l'activation de PP2A qui a également pour effet d'inactiver AKT et d'activer GSK3- β . Or AKT et GSK3- β sont des acteurs importants de la voie du BCR qui vont participer à l'inhibition de l'apoptose et la survie cellulaire à travers la stabilisation de MCL-1 (Baudot et al., 2009; Gobessi et al., 2009; Maurer et al., 2006). De même, DRP1 qui est impliqué dans la fission mitochondriale (Otera and Mihara, 2011), est une protéine qui subit divers processus d'ubiquitination. DRP1 est ubiquitinée par la Parkin (Wang et al., 2011a) et MARCH5 (Park et al., 2010) pour conduire à sa dégradation par le protéasome. Ce processus participe à la survie cellulaire car un excès de DRP1 entraîne la mort de la cellule. Plus intéressant encore est le rôle de l'E3 ligase HUWE1. Dans le stress cellulaire induit par la doxorubicine, HUWE1 est recrutée pour l'ubiquitination de Mfn2, une protéine impliquée dans la fusion mitochondriale, et sa dégradation (Leboucher et al., 2012). Mais HUWE1 est également une des E3 ligases identifiée dans l'ubiquitination et la dégradation de MCL-1 (Zhong et al., 2005). Cette E3 ligase se révèle donc importante à la fois dans la voie de survie du BCR et la régulation de la mitochondrie.

Cibler l'UPS peut présenter un intérêt supplémentaire à travers le stress protéotoxique engendré par l'accumulation de protéines ubiquitinées mal ou non repliées. L'accumulation de ces protéines induit une réponse aux protéines non repliées (Unfolded Protein Response ou UPR) qui peut conduire à l'apoptose (Menendez-Benito et al., 2005; Yadav et al., 2014). Une étude récente montre que l'inhibition du protéasome, ou des DUBs associées comme USP14 et UCHL5, peut participer au déclenchement de l'UPR via PERK et IRE1, des protéines de signalisation du stress du réticulum endoplasmique (RE) (Tian et al., 2014). De façon intéressante, une étude a montré que la protéine PERK régule l'homéostasie protéique de la mitochondrie et ses réponses aux agressions pathologiques (Rainbolt et al., 2014). Il existe donc une intrication importante entre le système ubiquitine-protéasome, la voie de réponse au stress protéotoxique et la régulation des fonctions mitochondriales. Dans ce contexte, nos travaux

(Article I) et une étude récente réalisée dans la LLC (Krysov et al., 2014) suggèrent un rôle du BCR et du microenvironnement tumoral dans la régulation de ces processus.

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'ubiquitination/déubiquitination, la régulation du protéasome, de l'UPR, de la mitochondrie et des processus de survie cellulaire qui en découlent, constituera certainement un atout majeur pour l'élaboration de nouveaux traitements des hémopathies lymphoïdes malignes et de leurs formes résistantes.

Références Bibliographiques

- Agathangelidis, A., N. Darzentas, A. Hadzidimitriou, X. Brochet, F. Murray, X.J. Yan, Z. Davis, E.J. van Gastel-Mol, C. Tresoldi, C.C. Chu, N. Cahill, V. Giudicelli, B. Tichy, L.B. Pedersen, L. Foroni, L. Bonello, A. Janus, K. Smedby, A. Anagnostopoulos, H. Merle-Beral, N. Laoutaris, G. Juliusson, P.F. di Celle, S. Pospisilova, J. Jurlander, C. Geisler, A. Tsaftaris, M.P. Lefranc, A.W. Langerak, D.G. Oscier, N. Chiorazzi, C. Belessi, F. Davi, R. Rosenquist, P. Ghia, and K. Stamatopoulos. 2012. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 119:4467-4475.
- Al-Hakim, A., C. Escribano-Díaz, M.C. Landry, L. O'Donnell, S. Panier, R.K. Szilard, and D. Durocher. 2010. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 9:1229-1240.
- Al-Hakim, A.K., A. Zagorska, L. Chapman, M. Deak, M. Peggie, and D.R. Alessi. 2008. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*. 411:249-260.
- Alizadeh, A.A., M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M.R. Grever, J.C. Byrd, D. Botstein, P.O. Brown, and L.M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403:503-511.
- Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster. 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 27:190-202.
- Alt, F.W. 1986. Antibody diversity. New mechanism revealed. *Nature*. 322:772-773.
- Alwan, H.A., and J.E. van Leeuwen. 2007. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J Biol Chem*. 282:1658-1669.
- Andersson, F.I., E.F. Werrell, L. McMorran, W.J. Crone, C. Das, S.T. Hsu, and S.E. Jackson. 2011. The effect of Parkinson's-disease-associated mutations on the deubiquitinating enzyme UCH-L1. *J Mol Biol*. 407:261-272.
- Ansel, K.M., V.N. Ngo, P.L. Hyman, S.A. Luther, R. Forster, J.D. Sedgwick, J.L. Browning, M. Lipp, and J.G. Cyster. 2000. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 406:309-314.
- Aressy, B., D. Jullien, M. Cazales, M. Marcellin, B. Bugler, O. Burlet-Schiltz, and B. Ducommun. 2010. A screen for deubiquitinating enzymes involved in the G(2)/M checkpoint identifies USP50 as a regulator of HSP90-dependent Wee1 stability. *Cell Cycle*. 9:3815-3822.
- Arnoult, D., B. Gaume, M. Karbowski, J.C. Sharpe, F. Cecconi, and R.J. Youle. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*. 22:4385-4399.
- Atanassov, B.S., E. Koutelou, and S.Y. Dent. 2011. The role of deubiquitinating enzymes in chromatin regulation. *FEBS Lett*. 585:2016-2023.
- Awan, F.T., N.E. Kay, M.E. Davis, W. Wu, S.M. Geyer, N. Leung, D.F. Jelinek, R.C. Tschumper, C.R. Secreto, T.S. Lin, M.R. Grever, T.D. Shanafelt, C.S. Zent, T.G. Call, N.A. Heerema, G. Lozanski, J.C. Byrd, and D.M. Lucas. 2009. Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood*. 113:535-537.

- Azuma, H., S. Takahara, N. Ichimaru, J.D. Wang, Y. Itoh, Y. Otsuki, J. Morimoto, R. Fukui, M. Hoshiga, T. Ishihara, N. Nonomura, S. Suzuki, A. Okuyama, and Y. Katsuoka. 2002. Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res.* 62:1410-1419.
- Baboshina, O.V., and A.L. Haas. 1996. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem.* 271:2823-2831.
- Badoux, X.C., M.J. Keating, S. Wen, B.N. Lee, M. Sivina, J. Reuben, W.G. Wierda, S.M. O'Brien, S. Faderl, S.M. Kornblau, J.A. Burger, and A. Ferrajoli. 2011. Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 118:3489-3498.
- Badura, S., T. Tesanovic, H. Pfeifer, S. Wystub, B.A. Nijmeijer, M. Liebermann, J.H. Falkenburg, M. Ruthardt, and O.G. Ottmann. 2013. Differential effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 8:e80070.
- Bagnara, D., M.S. Kaufman, C. Calissano, S. Marsilio, P.E. Patten, R. Simone, P. Chum, X.J. Yan, S.L. Allen, J.E. Kolitz, S. Baskar, C. Rader, H. Mellstedt, H. Rabbani, A. Lee, P.K. Gregersen, K.R. Rai, and N. Chiorazzi. 2011. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood.* 117:5463-5472.
- Bahi, N., J. Zhang, M. Llovera, M. Ballester, J.X. Comella, and D. Sanchis. 2006. Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 281:22943-22952.
- Baudot, A.D., P.Y. Jeandel, X. Mouska, U. Maurer, S. Tartare-Deckert, S.D. Raynaud, J.P. Cassuto, M. Ticchioni, and M. Deckert. 2009. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene.* 28:3261-3273.
- Bellacosa, A., T.O. Chan, N.N. Ahmed, K. Datta, S. Malstrom, D. Stokoe, F. McCormick, J. Feng, and P. Tsichlis. 1998. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene.* 17:313-325.
- Bende, R.J., F. van Maldegem, and C.J. van Noesel. 2009. Chronic inflammatory disease, lymphoid tissue neogenesis and extranodal marginal zone B-cell lymphomas. *Haematologica.* 94:1109-1123.
- Berndt, S.I., C.F. Skibola, V. Joseph, N.J. Camp, A. Nieters, Z. Wang, W. Cozen, A. Monnereau, S.S. Wang, R.S. Kelly, Q. Lan, L.R. Teras, N. Chatterjee, C.C. Chung, M. Yeager, A.R. Brooks-Wilson, P. Hartge, M.P. Purdue, B.M. Birmann, B.K. Armstrong, P. Cocco, Y. Zhang, G. Severi, A. Zeleniuch-Jacquotte, C. Lawrence, L. Burdette, J. Yuenger, A. Hutchinson, K.B. Jacobs, T.G. Call, T.D. Shanafelt, A.J. Novak, N.E. Kay, M. Liebow, A.H. Wang, K.E. Smedby, H.O. Adami, M. Melbye, B. Glimelius, E.T. Chang, M. Glenn, K. Curtin, L.A. Cannon-Albright, B. Jones, W.R. Diver, B.K. Link, G.J. Weiner, L. Conde, P.M. Bracci, J. Riby, E.A. Holly, M.T. Smith, R.D. Jackson, L.F. Tinker, Y. Benavente, N. Becker, P. Boffetta, P. Brennan, L. Foretova, M. Maynadie, J. McKay, A. Staines, K.G. Rabe, S.J. Achenbach, C.M. Vachon, L.R. Goldin, S.S. Strom, M.C. Lanasa, L.G. Spector, J.F. Leis, J.M. Cunningham, J.B. Weinberg, V.A. Morrison, N.E. Caporaso, A.D. Norman, M.S. Linet, A.J. De Roos, L.M. Morton, R.K. Severson, E. Riboli, P. Vineis, R. Kaaks, D. Trichopoulos, G. Masala, E. Weiderpass, M.D. Chirlaque, R.C. Vermeulen, R.C. Travis, G.G. Giles, D. Albanes, J. Virtamo, S. Weinstein, J. Clavel, T. Zheng, T.R. Holford, K. Offit, A. Zelenetz, R.J. Klein, J.J. Spinelli, K.A. Bertrand, et al. 2013. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 45:868-876.
- Bezbradica, J.S., and R. Medzhitov. 2012. Role of ITAM signaling module in signal integration. *Curr Opin Immunol.* 24:58-66.

- Binder, M., B. Lechenne, R. Ummanni, C. Scharf, S. Balabanov, M. Trusch, H. Schluter, I. Braren, E. Spillner, and M. Trepel. 2010. Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS One*. 5:e15992.
- Binet, J.L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguët, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M.T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, and F. Gremy. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 48:198-206.
- Bingle, C.D., R.W. Craig, B.M. Swales, V. Singleton, P. Zhou, and M.K. Whyte. 2000. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem*. 275:22136-22146.
- Bodet, L., P. Gomez-Bougie, C. Touzeau, C. Dousset, G. Descamps, S. Maiga, H. Avet-Loiseau, R. Bataille, P. Moreau, S. Le Gouill, C. Pellat-Deceunynck, and M. Amiot. 2011. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood*. 118:3901-3910.
- Boname, J.M., M. Thomas, H.R. Stagg, P. Xu, J. Peng, and P.J. Lehner. 2010. Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic*. 11:210-220.
- Borodovsky, A., H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K.D. Wilkinson, H.L. Ploegh, and B.M. Kessler. 2002. Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chemistry & biology*. 9:1149-1159.
- Brachtl, G., K. Sahakyan, U. Denk, T. Girbl, B. Alinger, S.W. Hofbauer, D. Neureiter, J.P. Hofbauer, A. Egle, R. Greil, and T.N. Hartmann. 2011. Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One*. 6:e23758.
- Brack, C., M. Hirama, R. Lenhard-Schuller, and S. Tonegawa. 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*. 15:1-14.
- Bras, M., V.J. Yuste, G. Roue, S. Barbier, P. Sancho, C. Virely, M. Rubio, S. Baudet, J.E. Esquerda, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S.A. Susin. 2007. Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol*. 27:7073-7088.
- Brinkmann, V., A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhye, and P. Burtin. 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 9:883-897.
- Buchner, M., S. Fuchs, G. Prinz, D. Pfeifer, K. Bartholome, M. Burger, N. Chevalier, L. Vallat, J. Timmer, J.G. Gribben, H. Jumaa, H. Veelken, C. Dierks, and K. Zirik. 2009. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 69:5424-5432.
- Burger, J.A. 2011. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011:96-103.
- Burger, J.A. 2014. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep*. 9:44-49.
- Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps. 1999. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 94:3658-3667.
- Burger, J.A., P. Ghia, A. Rosenwald, and F. Caligaris-Cappio. 2009a. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 114:3367-3375.
- Burger, J.A., M.P. Quiroga, E. Hartmann, A. Burkle, W.G. Wierda, M.J. Keating, and A. Rosenwald. 2009b. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 113:3050-3058.
- Burger, J.A., N. Tsukada, M. Burger, N.J. Zvaifler, M. Dell'Aquila, and T.J. Kipps. 2000. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 96:2655-2663.

- Burkle, A., M. Niedermeier, A. Schmitt-Graff, W.G. Wierda, M.J. Keating, and J.A. Burger. 2007. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 110:3316-3325.
- Caligaris-Cappio, F., and T.J. Hamblin. 1999. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 17:399-408.
- Calin, G.A., A. Cimmino, M. Fabbri, M. Ferracin, S.E. Wojcik, M. Shimizu, C. Taccioli, N. Zanesi, R. Garzon, R.I. Aqeilan, H. Alder, S. Volinia, L. Rassenti, X. Liu, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce. 2008. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:5166-5171.
- Calissano, C., R.N. Damle, G. Hayes, E.J. Murphy, M.K. Hellerstein, C. Moreno, C. Sison, M.S. Kaufman, J.E. Kolitz, S.L. Allen, K.R. Rai, and N. Chiorazzi. 2009. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 114:4832-4842.
- Campos, L., J.P. Rouault, O. Sabido, P. Oriol, N. Roubi, C. Vasselon, E. Archimbaud, J.P. Magaud, and D. Guyotat. 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*. 81:3091-3096.
- Caravita, T., P. de Fabritiis, A. Palumbo, S. Amadori, and M. Boccadoro. 2006. Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. *Nat Clin Pract Oncol*. 3:374-387.
- Carsetti, L., L. Laurenti, S. Gobessi, P.G. Longo, G. Leone, and D.G. Efremov. 2009. Phosphorylation of the activation loop tyrosines is required for sustained Syk signaling and growth factor-independent B-cell proliferation. *Cell Signal*. 21:1187-1194.
- Cerhan, J.R., S.M. Ansell, Z.S. Fredericksen, N.E. Kay, M. Liebow, T.G. Call, A. Dogan, J.M. Cunningham, A.H. Wang, W. Liu-Mares, W.R. Macon, D. Jelinek, T.E. Witzig, T.M. Habermann, and S.L. Slager. 2007. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 110:4455-4463.
- Cesen, M.H., K. Pegan, A. Spes, and B. Turk. 2012. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*. 318:1245-1251.
- Chang, C.R., and C. Blackstone. 2007. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem*. 282:21583-21587.
- Chastagner, P., A. Israel, and C. Brou. 2006. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*. 7:1147-1153.
- Chen, L., G. Widhopf, L. Huynh, L. Rassenti, K.R. Rai, A. Weiss, and T.J. Kipps. 2002. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100:4609-4614.
- Chen, M., G.J. Gutierrez, and Z.A. Ronai. 2011. Ubiquitin-recognition protein Ufd1 couples the endoplasmic reticulum (ER) stress response to cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:9119-9124.
- Chiarle, R., L.M. Budel, J. Skolnik, G. Frizzera, M. Chilosi, A. Corato, G. Pizzolo, J. Magidson, A. Montagnoli, M. Pagano, B. Maes, C. De Wolf-Peeters, and G. Inghirami. 2000. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 95:619-626.
- Chiorazzi, N., and M. Ferrarini. 2011. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 117:1781-1791.
- Choi, A.M., S.W. Ryter, and B. Levine. 2013. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 368:1845-1846.
- Choi, M.Y., and T.J. Kipps. 2012. Inhibitors of B-cell receptor signaling for patients with B-cell malignancies. *Cancer J*. 18:404-410.

- Ciechanover, A., H. Heller, S. Elias, A.L. Haas, and A. Hershko. 1980. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:1365-1368.
- Clarke, C.A., S.L. Glaser, S.L. Gomez, S.S. Wang, T.H. Keegan, J. Yang, and E.T. Chang. 2011. Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20:1064-1077.
- Clohessy, J.G., J. Zhuang, and H.J. Brady. 2004. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol*. 125:655-665.
- Coelho, V., S. Krysov, A.M. Ghaemmaghami, M. Emara, K.N. Potter, P. Johnson, G. Packham, L. Martinez-Pomares, and F.K. Stevenson. 2010. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:18587-18592.
- Colell, A., J.E. Ricci, S. Tait, S. Milasta, U. Maurer, L. Bouchier-Hayes, P. Fitzgerald, A. Guio-Carrion, N.J. Waterhouse, C.W. Li, B. Mari, P. Barbry, D.D. Newmeyer, H.M. Beere, and D.R. Green. 2007. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*. 129:983-997.
- Colland, F., E. Formstecher, X. Jacq, C. Reverdy, C. Planquette, S. Conrath, V. Trouplin, J. Bianchi, V.N. Aushev, J. Camonis, A. Calabrese, C. Borg-Capra, W. Sippl, V. Collura, G. Boissy, J.C. Rain, P. Guedat, R. Delansorne, and L. Daviet. 2009. Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther*. 8:2286-2295.
- Contri, A., A.M. Brunati, L. Trentin, A. Cabrelle, M. Miorin, L. Cesaro, L.A. Pinna, R. Zambello, G. Semenzato, and A. Donella-Deana. 2005. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 115:369-378.
- Cope, G.A., G.S. Suh, L. Aravind, S.E. Schwarz, S.L. Zipursky, E.V. Koonin, and R.J. Deshaies. 2002. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*. 298:608-611.
- Counter, C.M., J. Gupta, C.B. Harley, B. Leber, and S. Bacchetti. 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*. 85:2315-2320.
- Coupland, S.E. 2011. The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology*. 58:69-80.
- Craig, V.J., S.B. Cogliatti, I. Arnold, C. Gerke, J.E. Balandat, T. Wundisch, and A. Muller. 2010. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in Helicobacter-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia*. 24:1186-1196.
- Cramer, P., and M. Hallek. 2011. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*. 8:38-47.
- Crawford, L.J., and A.E. Irvine. 2013. Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies. *Blood Rev*. 27:297-304.
- Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo, and E. Montserrat. 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 348:1764-1775.
- Creton, S., and S. Jentsch. 2010. SnapShot: The SUMO system. *Cell*. 143:848-848 e841.
- Cribbs, J.T., and S. Strack. 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep*. 8:939-944.
- Croxton, R., Y. Ma, L. Song, E.B. Haura, and W.D. Cress. 2002. Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene*. 21:1359-1369.

- D'Arcy, P., S. Brnjic, M.H. Olofsson, M. Fryknas, K. Lindsten, M. De Cesare, P. Perego, B. Sadeghi, M. Hassan, R. Larsson, and S. Linder. 2011. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med.* 17:1636-1640.
- D'Arcy, P., and S. Linder. 2012. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:1729-1738.
- D'Arena, G., and P. Musto. 2014. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Transl Med UniSa.* 8:75-79.
- D'Arena, G., G. Rossi, B. Vannata, S. Deaglio, G. Mansueto, F. D'Auria, T. Statuto, V. Simeon, L. De Martino, A. Marandino, G. Del Poeta, V. De Feo, and P. Musto. 2012. Regulatory T-Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Autoimmune Diseases. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases.* 4:e2012053.
- Damle, R.N., F.M. Batliwalla, F. Ghiotto, A. Valetto, E. Albesiano, C. Sison, S.L. Allen, J. Kolitz, V.P. Vinciguerra, P. Kudalkar, T. Wasil, K.R. Rai, M. Ferrarini, P.K. Gregersen, and N. Chiorazzi. 2004. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood.* 103:375-382.
- Damle, R.N., S. Temburni, C. Calissano, S. Yancopoulos, T. Banapour, C. Sison, S.L. Allen, K.R. Rai, and N. Chiorazzi. 2007. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood.* 110:3352-3359.
- Damle, R.N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S.L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S.M. Lichtman, P. Schulman, V.P. Vinciguerra, K.R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 94:1840-1847.
- Das, G., B.V. Shrivage, and E.H. Baehrecke. 2012. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4.
- Davis, R.E., K.D. Brown, U. Siebenlist, and L.M. Staudt. 2001. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med.* 194:1861-1874.
- Davis, R.E., V.N. Ngo, G. Lenz, P. Tolar, R.M. Young, P.B. Romesser, H. Kohlhammer, L. Lamy, H. Zhao, Y. Yang, W. Xu, A.L. Shaffer, G. Wright, W. Xiao, J. Powell, J.K. Jiang, C.J. Thomas, A. Rosenwald, G. Ott, H.K. Muller-Hermelink, R.D. Gascoyne, J.M. Connors, N.A. Johnson, L.M. Rimsza, E. Campo, E.S. Jaffe, W.H. Wilson, J. Delabie, E.B. Smeland, R.I. Fisher, R.M. Braziel, R.R. Tubbs, J.R. Cook, D.D. Weisenburger, W.C. Chan, S.K. Pierce, and L.M. Staudt. 2010. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 463:88-92.
- Dawar, R., and F. Hernandez-Ilizaliturri. 2012. The emerging role of lenalidomide in the management of mantle cell lymphoma (MCL). *Best Pract Res Clin Haematol.* 25:185-190.
- Dayal, S., A. Sparks, J. Jacob, N. Allende-Vega, D.P. Lane, and M.K. Saville. 2009. Suppression of the deubiquitinating enzyme USP5 causes the accumulation of unanchored polyubiquitin and the activation of p53. *J Biol Chem.* 284:5030-5041.
- De Pitta, C., L. Tombolan, M. Campo Dell'Orto, B. Accordi, G. te Kronnie, C. Romualdi, N. Vitulo, G. Basso, and G. Lanfranchi. 2005. A leukemia-enriched cDNA microarray platform identifies new transcripts with relevance to the biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 90:890-898.
- Deaglio, S., T. Vaisitti, S. Aydin, L. Bergui, G. D'Arena, L. Bonello, P. Omede, M. Scatolini, O. Jaksic, G. Chiorino, D. Efremov, and F. Malavasi. 2007. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood.* 110:4012-4021.
- Deaglio, S., T. Vaisitti, L. Bergui, L. Bonello, A.L. Horenstein, L. Tamagnone, L. Boumsell, and F. Malavasi. 2005. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood.* 105:3042-3050.

- Deglesne, P.A., N. Chevallier, R. Letestu, F. Baran-Marszak, T. Beitar, C. Salanoubat, L. Sanhes, J. Nataf, C. Roger, N. Varin-Blank, and F. Ajchenbaum-Cymbalista. 2006. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* 66:7158-7166.
- Del Poeta, G., L. Maurillo, A. Venditti, F. Buccisano, A.M. Epiceno, G. Capelli, A. Tamburini, G. Suppo, A. Battaglia, M.I. Del Principe, B. Del Moro, M. Masi, and S. Amadori. 2001. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 98:2633-2639.
- Del Principe, M.I., G. Del Poeta, F. Buccisano, L. Maurillo, A. Venditti, A. Zucchetto, R. Marini, P. Niscola, M.A. Consalvo, C. Mazzone, L. Ottaviani, P. Panetta, A. Bruno, R. Bomben, G. Suppo, M. Degan, V. Gattei, P. de Fabritiis, M. Cantonetti, F. Lo Coco, D. Del Principe, and S. Amadori. 2006. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 108:853-861.
- Delgado, P., B. Cubelos, E. Calleja, N. Martinez-Martin, A. Cipres, I. Merida, C. Bellas, X.R. Bustelo, and B. Alarcon. 2009. Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol.* 10:880-888.
- Delmont, E., P.Y. Jeandel, C. Benaim, E. Rosenthal, J.G. Fuzibet, and C. Desnuelle. 2011. Treatment with rituximab in patients with polyneuropathy with anti-MAG antibodies. *Journal of neurology.* 258:1717-1719.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z.J. Chen. 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* 103:351-361.
- Deng, X., F. Gao, and W.S. May. 2009. Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. *Blood.* 113:422-428.
- Dewald, G.W., S.R. Brockman, S.F. Paternoster, N.D. Bone, J.R. O'Fallon, C. Allmer, C.D. James, D.F. Jelinek, R.C. Tschumper, C.A. Hanson, R.K. Pruthi, T.E. Witzig, T.G. Call, and N.E. Kay. 2003. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 121:287-295.
- Dickey, A.S., and S. Strack. 2011. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J Neurosci.* 31:15716-15726.
- Dierlamm, J., M. Baens, I. Wlodarska, M. Stefanova-Ouzounova, J.M. Hernandez, D.K. Hossfeld, C. De Wolf-Peters, A. Hagemeijer, H. Van den Berghe, and P. Marynen. 1999. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood.* 93:3601-3609.
- Dighiero, G., K. Maloum, B. Desablens, B. Cazin, M. Navarro, R. Leblay, M. Leporrier, J. Jaubert, G. Lepeu, B. Dreyfus, J.L. Binet, and P. Travade. 1998. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 338:1506-1514.
- Dighiero, G., P. Travade, S. Chevret, P. Fenaux, C. Chastang, and J.L. Binet. 1991. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood.* 78:1901-1914.
- Dikic, I., S. Wakatsuki, and K.J. Walters. 2009. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:659-671.
- Ding, Q., X. He, J.M. Hsu, W. Xia, C.T. Chen, L.Y. Li, D.F. Lee, J.C. Liu, Q. Zhong, X. Wang, and M.C. Hung. 2007. Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol.* 27:4006-4017.
- Ding, W., G.S. Nowakowski, T.R. Knox, J.C. Boysen, M.L. Maas, S.M. Schwager, W. Wu, L.E. Wellik, A.B. Dietz, A.K. Ghosh, C.R. Secreto, K.L. Medina, T.D. Shanafelt, C.S. Zent, T.G. Call, and N.E. Kay.

2009. Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol.* 147:471-483.
- Dohner, H., K. Fischer, M. Bentz, K. Hansen, A. Benner, G. Cabot, D. Diehl, R. Schlenk, J. Coy, S. Stilgenbauer, and et al. 1995. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood.* 85:1580-1589.
- Dohner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, and P. Lichter. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343:1910-1916.
- Doil, C., N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D.H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas, and C. Lukas. 2009. RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell.* 136:435-446.
- Domina, A.M., J.A. Vrana, M.A. Gregory, S.R. Hann, and R.W. Craig. 2004. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene.* 23:5301-5315.
- Dreger, P., P. Corradini, E. Kimby, M. Michallet, D. Milligan, J. Schetelig, W. Wiktor-Jedrzejczak, D. Niederwieser, M. Hallek, and E. Montserrat. 2007. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia.* 21:12-17.
- Duda, D.M., D.C. Scott, M.F. Calabrese, E.S. Zimmerman, N. Zheng, and B.A. Schulman. 2011. Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 21:257-264.
- Duex, J.E., L. Comeau, A. Sorkin, B. Purow, and B. Kefas. 2011. Usp18 regulates epidermal growth factor (EGF) receptor expression and cancer cell survival via microRNA-7. *J Biol Chem.* 286:25377-25386.
- Duncan, L.M., S. Piper, R.B. Dodd, M.K. Saville, C.M. Sanderson, J.P. Luzio, and P.J. Lehner. 2006. Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J.* 25:1635-1645.
- Duprez, L., N. Takahashi, F. Van Hauwermeiren, B. Vandendriessche, V. Goossens, T. Vanden Berghe, W. Declercq, C. Libert, A. Cauwels, and P. Vandenabeele. 2011. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity.* 35:908-918.
- Ea, C.K., L. Deng, Z.P. Xia, G. Pineda, and Z.J. Chen. 2006. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell.* 22:245-257.
- Eichhorst, B.F., R. Busch, G. Hopfinger, R. Pasold, M. Hensel, C. Steinbrecher, S. Siehl, U. Jager, M. Bergmann, S. Stilgenbauer, C. Schweighofer, C.M. Wendtner, H. Dohner, G. Brittinger, B. Emmerich, and M. Hallek. 2006. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 107:885-891.
- Eichhorst, B.F., R. Busch, S. Stilgenbauer, M. Stauch, M.A. Bergmann, M. Ritgen, N. Kranzhofer, R. Rohrberg, U. Soling, O. Burkhard, A. Westermann, V. Goede, C.D. Schweighofer, K. Fischer, A.M. Fink, C.M. Wendtner, G. Brittinger, H. Dohner, B. Emmerich, and M. Hallek. 2009. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 114:3382-3391.
- Emmerich, C.H., A. Ordureau, S. Strickson, J.S. Arthur, P.G. Pedrioli, D. Komander, and P. Cohen. 2013. Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:15247-15252.
- Endo, T., M. Nishio, T. Enzler, H.B. Cottam, T. Fukuda, D.F. James, M. Karin, and T.J. Kipps. 2007. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood.* 109:703-710.

- Fabris, S., L. Mosca, K. Todoerti, G. Cutrona, M. Lionetti, D. Intini, S. Matis, M. Colombo, L. Agnelli, M. Gentile, M. Spriano, V. Callea, G. Festini, S. Molica, G. Lambertenghi Delilieri, F. Morabito, M. Ferrarini, and A. Neri. 2008. Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 47:781-793.
- Fan, Y.H., Y. Yu, R.F. Mao, X.J. Tan, G.F. Xu, H. Zhang, X.B. Lu, S.B. Fu, and J. Yang. 2011. USP4 targets TAK1 to downregulate TNF α -induced NF- κ B activation. *Cell Death Differ*. 18:1547-1560.
- Ferraro, E., A. Pulicati, M.T. Cencioni, M. Cozzolino, F. Navoni, S. di Martino, R. Nardacci, M.T. Carri, and F. Cecconi. 2008. Apoptosome-deficient cells lose cytochrome c through proteasomal degradation but survive by autophagy-dependent glycolysis. *Mol Biol Cell*. 19:3576-3588.
- Figueroa, M.E., S. Lugthart, Y. Li, C. Erpelinck-Verschueren, X. Deng, P.J. Christos, E. Schifano, J. Booth, W. van Putten, L. Skrabanek, F. Campagne, M. Mazumdar, J.M. Greally, P.J. Valk, B. Lowenberg, R. Delwel, and A. Melnick. 2010. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 17:13-27.
- Finley, D. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 78:477-513.
- Fowler, N., and E. Davis. 2013. Targeting B-cell receptor signaling: changing the paradigm. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013:553-560.
- Fraille, J.M., V. Quesada, D. Rodriguez, J.M. Freije, and C. Lopez-Otin. 2012. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*. 31:2373-2388.
- Fukuda, T., L. Chen, T. Endo, L. Tang, D. Lu, J.E. Castro, G.F. Widhopf, 2nd, L.Z. Rassenti, M.J. Cantwell, C.E. Prussak, D.A. Carson, and T.J. Kipps. 2008. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:3047-3052.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 19:107-120.
- Gandhi, V., K. Balakrishnan, and L.S. Chen. 2008. Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood*. 112:3538-3540.
- Garofalo, M., G. Romano, C. Quintavalle, M.F. Romano, F. Chiurazzi, C. Zanca, and G. Condorelli. 2007. Selective inhibition of PED protein expression sensitizes B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 120:1215-1222.
- Gasparini, C., C. Celeghini, L. Monasta, and G. Zauli. 2014. NF- κ B pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci*. 71:2083-2102.
- Ge, X., and X. Wang. 2010. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*. 3:33.
- Geahlen, R.L. 2009. Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta*. 1793:1115-1127.
- Geetha, T., J. Jiang, and M.W. Wooten. 2005. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell*. 20:301-312.
- Gehrke, I., R.K. Gandhirajan, S.J. Poll-Wolbeck, M. Hallek, and K.A. Kreuzer. 2011. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Mol Med*. 17:619-627.
- Geier, J.K., and M.S. Schlissel. 2006. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Seminars in immunology*. 18:31-39.

- Geisen, C., H. Karsunky, R. Yucel, and T. Moroy. 2003. Loss of p27(Kip1) cooperates with cyclin E in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene*. 22:1724-1729.
- Gelsi-Boyer, V., V. Trouplin, J. Adelaide, N. Aceto, V. Remy, S. Pinson, C. Houdayer, C. Arnoulet, D. Sainty, M. Bentires-Alj, S. Olschwang, N. Vey, M.J. Mozziconacci, D. Birnbaum, and M. Chaffanet. 2008. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC cancer*. 8:299.
- Gentile, M., G. Cutrona, A. Neri, S. Molica, M. Ferrarini, and F. Morabito. 2009. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 94:887-888.
- Ghia, P., P. Circosta, C. Scielzo, A. Vallario, A. Camporeale, L. Granziero, and F. Caligaris-Cappio. 2005a. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 294:135-145.
- Ghia, P., K. Stamatopoulos, C. Belessi, C. Moreno, S. Stella, G. Guida, A. Michel, M. Crespo, N. Laoutaris, E. Montserrat, A. Anagnostopoulos, G. Dighiero, A. Fassas, F. Caligaris-Cappio, and F. Davi. 2005b. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 105:1678-1685.
- Ghia, P., G. Strola, L. Granziero, M. Geuna, G. Guida, F. Sallusto, N. Ruffing, L. Montagna, P. Piccoli, M. Chilosi, and F. Caligaris-Cappio. 2002. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 32:1403-1413.
- Gilson, E., and A. Londono-Vallejo. 2007. Telomere length profiles in humans: all ends are not equal. *Cell Cycle*. 6:2486-2494.
- Gobessi, S., L. Laurenti, P.G. Longo, L. Carsetti, V. Berno, S. Sica, G. Leone, and D.G. Efremov. 2009. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 23:686-697.
- Gobessi, S., L. Laurenti, P.G. Longo, S. Sica, G. Leone, and D.G. Efremov. 2007. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 109:2032-2039.
- Goede, V., K. Fischer, R. Busch, U. Jaeger, M.S. Dilhuydy, N. Wickham, S. De Guibert, M. Ritgen, A.W. Langerak, G. Bieska, A. Engelke, K. Humphrey, M. Wenger, and M. Hallek. 2013. Chemoimmunotherapy with GA101 plus chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidity: results of the CLL11 (BO21004) safety run-in. *Leukemia*. 27:1172-1174.
- Goemans, C.G., P. Boya, C.J. Skirrow, and A.M. Tolkovsky. 2008. Intra-mitochondrial degradation of Tim23 curtails the survival of cells rescued from apoptosis by caspase inhibitors. *Cell Death Differ*. 15:545-554.
- Gonzalez-Navajas, J.M., J. Law, K.P. Nguyen, M. Bhargava, M.P. Corr, N. Varki, L. Eckmann, H.M. Hoffman, J. Lee, and E. Raz. 2010. Interleukin 1 receptor signaling regulates DUBA expression and facilitates Toll-like receptor 9-driven antiinflammatory cytokine production. *J Exp Med*. 207:2799-2807.
- Gopal, A.K., S.R. Tarantolo, N. Bellam, D.J. Green, M. Griffin, T. Feldman, A.R. Mato, A.J. Eisenfeld, S.C. Stromatt, and A. Goy. 2014. Phase 1b study of otlertuzumab (TRU-016), an anti-CD37 monospecific ADAPTIR therapeutic protein, in combination with rituximab and bendamustine in relapsed indolent lymphoma patients. *Invest New Drugs*.
- Granziero, L., P. Ghia, P. Circosta, D. Gottardi, G. Strola, M. Geuna, L. Montagna, P. Piccoli, M. Chilosi, and F. Caligaris-Cappio. 2001. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 97:2777-2783.
- Graziadei, L., K. Riabowol, and D. Bar-Sagi. 1990. Co-capping of ras proteins with surface immunoglobulins in B lymphocytes. *Nature*. 347:396-400.

- Gribben, J.G. 2010. How I treat CLL up front. *Blood*. 115:187-197.
- Gritti, G., G. Reda, F. Maura, A. Piciocchi, L. Baldini, S. Molica, A. Neri, and A. Cortelezzi. 2012. Low dose alemtuzumab in patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 53:424-429.
- Groll, M., M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D.M. Rubin, R. Huber, M.H. Glickman, and D. Finley. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*. 7:1062-1067.
- Grzybowska-Izydorczyk, O., B. Cebula, T. Robak, and P. Smolewski. 2010. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer*. 46:800-810.
- Guervilly, J.H., E. Renaud, M. Takata, and F. Rosselli. 2011. USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet*. 20:2171-2181.
- Guterman, A., and M.H. Glickman. 2004. Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem*. 279:1729-1738.
- Hachem, A., and R.B. Gartenhaus. 2005. Oncogenes as molecular targets in lymphoma. *Blood*. 106:1911-1923.
- Hackanson, B., Y. Guo, and M. Lubbert. 2005. The silence of the genes: epigenetic disturbances in haematopoietic malignancies. *Expert Opin Ther Targets*. 9:45-61.
- Hagenbuchner, J., M.J. Ausserlechner, V. Porto, R. David, B. Meister, M. Bodner, A. Villunger, K. Geiger, and P. Obexer. 2010. The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression. *J Biol Chem*. 285:6904-6912.
- Haglund, K., P.P. Di Fiore, and I. Dikic. 2003. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci*. 28:598-603.
- Haiat, S., C. Billard, C. Quiney, F. Ajchenbaum-Cymbalista, and J.P. Kolb. 2006. Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 118:281-292.
- Hallek, M., B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M.J. Keating, E. Montserrat, K.R. Rai, and T.J. Kipps. 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 111:5446-5456.
- Hallek, M., K. Fischer, G. Fingerle-Rowson, A.M. Fink, R. Busch, J. Mayer, M. Hensel, G. Hopfinger, G. Hess, U. von Grunhagen, M. Bergmann, J. Catalano, P.L. Zinzani, F. Caligaris-Cappio, J.F. Seymour, A. Berrebi, U. Jager, B. Cazin, M. Trneny, A. Westermann, C.M. Wendtner, B.F. Eichhorst, P. Staib, A. Buhler, D. Winkler, T. Zenz, S. Bottcher, M. Ritgen, M. Mendila, M. Kneba, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2010. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 376:1164-1174.
- Hallek, M., I. Langenmayer, C. Nerl, W. Knauf, H. Dietzfelbinger, D. Adorf, M. Ostwald, R. Busch, I. Kuhn-Hallek, E. Thiel, and B. Emmerich. 1999. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 93:1732-1737.
- Hamblin, T.J., Z. Davis, A. Gardiner, D.G. Oscier, and F.K. Stevenson. 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 94:1848-1854.
- Hamblin, T.J., J.A. Orchard, R.E. Ibbotson, Z. Davis, P.W. Thomas, F.K. Stevenson, and D.G. Oscier. 2002. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 99:1023-1029.

- Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, and J.C. Reed. 1993. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 82:1820-1828.
- Hanna, J., N.A. Hathaway, Y. Tone, B. Crosas, S. Elsasser, D.S. Kirkpatrick, D.S. Leggett, S.P. Gygi, R.W. King, and D. Finley. 2006. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell*. 127:99-111.
- Harhaj, E.W., and V.M. Dixit. 2011. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res*. 21:22-39.
- Harley, M.E., L.A. Allan, H.S. Sanderson, and P.R. Clarke. 2010. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J*. 29:2407-2420.
- Harris, S.L., and A.J. Levine. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24:2899-2908.
- Hashimoto, A., H. Okada, A. Jiang, M. Kurosaki, S. Greenberg, E.A. Clark, and T. Kurosaki. 1998. Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *J Exp Med*. 188:1287-1295.
- Hashimoto, S., M. Dono, M. Wakai, S.L. Allen, S.M. Lichtman, P. Schulman, V.P. Vinciguerra, M. Ferrarini, J. Silver, and N. Chiorazzi. 1995. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med*. 181:1507-1517.
- Hatakeyama, S., M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, and K.I. Nakayama. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*. 276:33111-33120.
- Hayat, A., D. O'Brien, P. O'Rourke, S. McGuckin, T. Fitzgerald, E. Conneally, P.V. Browne, S.R. McCann, M.P. Lawler, and E. Vandenberghe. 2006. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 47:2371-2379.
- Hennessy, B.T., E.O. Hanrahan, and P.A. Daly. 2004. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *The Lancet Oncology*. 5:341-353.
- Herishanu, Y., P. Perez-Galan, D. Liu, A. Biancotto, S. Pittaluga, B. Vire, F. Gibellini, N. Njuguna, E. Lee, L. Stennett, N. Raghavachari, P. Liu, J.P. McCoy, M. Raffeld, M. Stetler-Stevenson, C. Yuan, R. Sherry, D.C. Arthur, I. Maric, T. White, G.E. Marti, P. Munson, W.H. Wilson, and A. Wiestner. 2011. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 117:563-574.
- Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67:425-479.
- Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A.L. Haas, and I.A. Rose. 1980. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:1783-1786.
- Hershko, A., A. Ciechanover, and I.A. Rose. 1981. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem*. 256:1525-1528.
- Hershko, A., H. Heller, S. Elias, and A. Ciechanover. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*. 258:8206-8214.
- Hershko, A., E. Leshinsky, D. Ganoth, and H. Heller. 1984. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:1619-1623.
- Herzog, S., M. Reth, and H. Jumaa. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 9:195-205.
- Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V.J. Palombella, P.J. Elliott, J. Adams, and K.C. Anderson. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 61:3071-3076.

- Hillmen, P., A.B. Skotnicki, T. Robak, B. Jaksic, A. Dmoszynska, J. Wu, C. Sirard, and J. Mayer. 2007. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 25:5616-5623.
- Hochstrasser, M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature.* 458:422-429.
- Hoogeboom, R., K.P. van Kessel, F. Hochstenbach, T.A. Wormhoudt, R.J. Reinten, K. Wagner, A.P. Kater, J.E. Guikema, R.J. Bende, and C.J. van Noesel. 2013. A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med.* 210:59-70.
- Hou, X., L. Wang, L. Zhang, X. Pan, and W. Zhao. 2013. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma. *FEBS Lett.* 587:311-316.
- Hsi, E.D. 2012. Pathologic and molecular genetic features of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 39:74-79.
- Hu, M., P. Li, L. Song, P.D. Jeffrey, T.A. Chenova, K.D. Wilkinson, R.E. Cohen, and Y. Shi. 2005. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J.* 24:3747-3756.
- Huang, D.T., H.W. Hunt, M. Zhuang, M.D. Ohi, J.M. Holton, and B.A. Schulman. 2007. Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature.* 445:394-398.
- Huang, F., D. Kirkpatrick, X. Jiang, S. Gygi, and A. Sorkin. 2006. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell.* 21:737-748.
- Huang, X., C. Langelotz, B.K. Hetfeld-Pechoc, W. Schwenk, and W. Dubiel. 2009. The COP9 signalosome mediates beta-catenin degradation by deneddylation and blocks adenomatous polyposis coli destruction via USP15. *J Mol Biol.* 391:691-702.
- Huang, X., M.K. Summers, V. Pham, J.R. Lill, J. Liu, G. Lee, D.S. Kirkpatrick, P.K. Jackson, G. Fang, and V.M. Dixit. 2011. Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry. *Mol Cell.* 42:511-523.
- Hung, J.H., Y.S. Lu, Y.C. Wang, Y.H. Ma, D.S. Wang, S.K. Kulp, N. Muthusamy, J.C. Byrd, A.L. Cheng, and C.S. Chen. 2008. FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling. *Cancer Res.* 68:1204-1212.
- Hussain, S., Y. Zhang, and P.J. Galardy. 2009. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle.* 8:1688-1697.
- Iacobucci, I., C. Papayannidis, A. Lonetti, A. Ferrari, M. Bacarani, and G. Martinelli. 2012. Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments. *Curr Hematol Malig Rep.* 7:133-143.
- Imamura, Y., A. Oda, T. Katahira, K. Bundo, K.A. Pike, M.J. Ratcliffe, and D. Kitamura. 2009. BLNK binds active H-Ras to promote B cell receptor-mediated capping and ERK activation. *J Biol Chem.* 284:9804-9813.
- Institut de veille sanitaire. 2013. Estimation de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1980 à 2012.
- Inuzuka, H., S. Shaik, I. Onoyama, D. Gao, A. Tseng, R.S. Maser, B. Zhai, L. Wan, A. Gutierrez, A.W. Lau, Y. Xiao, A.L. Christie, J. Aster, J. Settleman, S.P. Gygi, A.L. Kung, T. Look, K.I. Nakayama, R.A. DePinho, and W. Wei. 2011. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature.* 471:104-109.
- Iwai, K. 2012. Synthesis and analysis of linear ubiquitin chains. *Methods Mol Biol.* 832:229-238.
- Jacquin, M.A., J. Chiche, B. Zunino, M. Beneteau, O. Meynet, L.A. Pradelli, S. Marchetti, A. Cornille, M. Carles, and J.E. Ricci. 2013. GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death. *Cell Death Differ.* 20:1043-1054.

- Jaleel, M., F. Villa, M. Deak, R. Toth, A.R. Prescott, D.M. Van Aalten, and D.R. Alessi. 2006. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem J.* 394:545-555.
- Jin, L., A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, and M. Rape. 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell.* 133:653-665.
- Jin, Z., Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V.C. Pham, J.R. Lill, and A. Ashkenazi. 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell.* 137:721-735.
- Johnson, E.S., P.C. Ma, I.M. Ota, and A. Varshavsky. 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem.* 270:17442-17456.
- Johnson, G.L., and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298:1911-1912.
- Johnston, S.C., C.N. Larsen, W.J. Cook, K.D. Wilkinson, and C.P. Hill. 1997. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* 16:3787-3796.
- Jung, H., B.G. Kim, W.H. Han, J.H. Lee, J.Y. Cho, W.S. Park, M.M. Maurice, J.K. Han, M.J. Lee, D. Finley, and E.H. Jho. 2013. Deubiquitination of Dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. *Oncogenesis.* 2:e64.
- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D.V. Krysko. 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 38:209-223.
- Kagedal, K., M. Zhao, I. Svensson, and U.T. Brunk. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J.* 359:335-343.
- Kane, R.C., R. Dagher, A. Farrell, C.W. Ko, R. Sridhara, R. Justice, and R. Pazdur. 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 13:5291-5294.
- Kappos, L., E.W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson, P. Burtin, and F.S. Group. 2010. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362:387-401.
- Kapuria, V., L.F. Peterson, D. Fang, W.G. Bornmann, M. Talpaz, and N.J. Donato. 2010. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* 70:9265-9276.
- Kay, N.E., S.M. Geyer, T.G. Call, T.D. Shanafelt, C.S. Zent, D.F. Jelinek, R. Tschumper, N.D. Bone, G.W. Dewald, T.S. Lin, N.A. Heerema, L. Smith, M.R. Grever, and J.C. Byrd. 2007. Combination chemoimmunotherapy with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab shows significant clinical activity with low accompanying toxicity in previously untreated B chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 109:405-411.
- Kee, B.L., and C. Murre. 1998. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med.* 188:699-713.
- Kepp, O., L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, and G. Kroemer. 2011. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 10:221-237.
- Kern, C., J.F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P.Y. Simonin, S. Feldblum, and J.P. Kolb. 2004. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood.* 103:679-688.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
- Kersseboom, R., S. Middendorp, G.M. Dingjan, K. Dahlenborg, M. Reth, H. Jumaa, and R.W. Hendriks. 2003. Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *J Exp Med.* 198:91-98.
- Khatri, B., F. Barkhof, G. Comi, H.P. Hartung, L. Kappos, X. Montalban, J. Pelletier, T. Stites, S. Wu, F. Holdbrook, L. Zhang-Auberson, G. Francis, J.A. Cohen, and T.S. Group. 2011. Comparison of

- fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised extension of the TRANSFORMS study. *The Lancet. Neurology*. 10:520-529.
- Kim, H.M., Y. Yu, and Y. Cheng. 2011. Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta*. 1809:67-79.
- Kim, J.H., and J. Bae. 2013. MCL-1ES induces MCL-1L-dependent BAX- and BAK-independent mitochondrial apoptosis. *PLoS One*. 8:e79626.
- Kirkegaard, T., and M. Jaattela. 2009. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1793:746-754.
- Kitada, S., J. Andersen, S. Akar, J.M. Zapata, S. Takayama, S. Krajewski, H.G. Wang, X. Zhang, F. Bullrich, C.M. Croce, K. Rai, J. Hines, and J.C. Reed. 1998. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 91:3379-3389.
- Kleiger, G., and T. Mayor. 2014. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol*. 24:352-359.
- Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 8:22-33.
- Klein, U., M. Lia, M. Crespo, R. Siegel, Q. Shen, T. Mo, A. Ambesi-Impiombato, A. Califano, A. Migliazza, G. Bhagat, and R. Dalla-Favera. 2010. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 17:28-40.
- Knapp, C.M., and K.A. Whitehead. 2014. In pursuit of a moving target: nanotherapeutics for the treatment of non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Expert opinion on drug delivery*:1-15.
- Knauf, W.U., T. Lissichkov, A. Aldaoud, A. Liberati, J. Loscertales, R. Herbrecht, G. Juliusson, G. Postner, L. Gercheva, S. Goranov, M. Becker, H.J. Fricke, F. Huguet, I. Del Giudice, P. Klein, L. Tremmel, K. Merkle, and M. Montillo. 2009. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 27:4378-4384.
- Knott, A.B., and E. Bossy-Wetzel. 2008. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 1147:283-292.
- Kobayashi, S., S.H. Lee, X.W. Meng, J.L. Mott, S.F. Bronk, N.W. Werneburg, R.W. Craig, S.H. Kaufmann, and G.J. Gores. 2007. Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J Biol Chem*. 282:18407-18417.
- Kojima, K., M. Konopleva, T. McQueen, S. O'Brien, W. Plunkett, and M. Andreeff. 2006. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 108:993-1000.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 37:937-953.
- Komander, D. 2010. Mechanism, specificity and structure of the deubiquitinases. *Subcell Biochem*. 54:69-87.
- Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:550-563.
- Komander, D., C.J. Lord, H. Scheel, S. Swift, K. Hofmann, A. Ashworth, and D. Barford. 2008. The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Mol Cell*. 29:451-464.
- Kon, N., Y. Kobayashi, M. Li, C.L. Brooks, T. Ludwig, and W. Gu. 2010. Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene*. 29:1270-1279.
- Konya, C., Y. Hatanaka, Y. Fujiwara, K. Uchida, Y. Nagai, K. Wada, and T. Kabuta. 2011. Parkinson's disease-associated mutations in alpha-synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. *Neurochem Int*. 59:251-258.

- Kraus, M., M.B. Alimzhanov, N. Rajewsky, and K. Rajewsky. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell*. 117:787-800.
- Krober, A., J. Bloehdorn, S. Hafner, A. Buhler, T. Seiler, D. Kienle, D. Winkler, M. Bangerter, R.F. Schlenk, A. Benner, P. Lichter, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2006. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 24:969-975.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 16:3-11.
- Krysov, S., A.J. Steele, V. Coelho, A. Linley, M. Sanchez Hidalgo, M. Carter, K.N. Potter, B. Kennedy, A.S. Duncombe, M. Ashton-Key, F. Forconi, F.K. Stevenson, and G. Packham. 2014. Stimulation of surface IgM of chronic lymphocytic leukemia cells induces an unfolded protein response dependent on BTK and SYK. *Blood*.
- Kuppers, R., R. Schmitz, V. Distler, C. Renne, A. Brauning, and M.L. Hansmann. 2005. Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *European journal of haematology. Supplementum*:26-33.
- Kurosaki, T., M. Takata, Y. Yamanashi, T. Inazu, T. Taniguchi, T. Yamamoto, and H. Yamamura. 1994. Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med*. 179:1725-1729.
- Lafont, E., R. Dupont, N. Andrieu-Abadie, T. Okazaki, K. Schulze-Osthoff, T. Levade, H. Benoist, and B. Segui. 2012. Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1821:684-693.
- Lagneaux, L., A. Delforge, D. Bron, C. De Bruyn, and P. Stryckmans. 1998. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 91:2387-2396.
- Lagneaux, L., A. Delforge, C. De Bruyn, M. Bernier, and D. Bron. 1999. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 35:445-453.
- Lam, Y.A., W. Xu, G.N. DeMartino, and R.E. Cohen. 1997. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*. 385:737-740.
- LaMontagne, K., A. Littlewood-Evans, C. Schnell, T. O'Reilly, L. Wyder, T. Sanchez, B. Probst, J. Butler, A. Wood, G. Liao, E. Billy, A. Theuer, T. Hla, and J. Wood. 2006. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res*. 66:221-231.
- Lamy, L. 2013. [Multiple myeloma and autophagy]. *Med Sci (Paris)*. 29:685-687.
- Lan, Q., T. Zheng, M. Shen, Y. Zhang, S.S. Wang, S.H. Zahm, T.R. Holford, B. Leaderer, P. Boyle, and S. Chanock. 2007. Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Human genetics*. 121:161-168.
- Larsen, C.N., B.A. Krantz, and K.D. Wilkinson. 1998. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*. 37:3358-3368.
- Lartigue, L., Y. Kushnareva, Y. Seong, H. Lin, B. Faustin, and D.D. Newmeyer. 2009. Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol Biol Cell*. 20:4871-4884.
- Latour, S., L.M. Chow, and A. Veillette. 1996. Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 271:22782-22790.
- Le Roy, C., P.A. Deglesne, N. Chevallier, T. Beitar, V. Eclache, M. Quettier, M. Boubaya, R. Letestu, V. Levy, F. Ajchenbaum-Cymbalista, and N. Varin-Blank. 2012. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 120:356-365.

- LeBien, T.W., and T.F. Tedder. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 112:1570-1580.
- Leboucher, G.P., Y.C. Tsai, M. Yang, K.C. Shaw, M. Zhou, T.D. Veenstra, M.H. Glickman, and A.M. Weissman. 2012. Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Mol Cell*. 47:547-557.
- Lee, B.H., M.J. Lee, S. Park, D.C. Oh, S. Elsasser, P.C. Chen, C. Gartner, N. Dimova, J. Hanna, S.P. Gygi, S.M. Wilson, R.W. King, and D. Finley. 2010. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 467:179-184.
- Lee, H., J.A. Rotolo, J. Mesicek, T. Penate-Medina, A. Rimner, W.C. Liao, X. Yin, G. Ragupathi, D. Ehleiter, E. Gulbins, D. Zhai, J.C. Reed, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. Kolesnick. 2011. Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS One*. 6:e19783.
- Leggett, D.S., J. Hanna, A. Borodovsky, B. Crosas, M. Schmidt, R.T. Baker, T. Walz, H. Ploegh, and D. Finley. 2002. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell*. 10:495-507.
- Lenz, G., and L.M. Staudt. 2010. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 362:1417-1429.
- Lenz, G., G. Wright, S.S. Dave, W. Xiao, J. Powell, H. Zhao, W. Xu, B. Tan, N. Goldschmidt, J. Iqbal, J. Vose, M. Bast, K. Fu, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner, J.O. Armitage, A. Kyle, L. May, R.D. Gascoyne, J.M. Connors, G. Troen, H. Holte, S. Kvaloy, D. Dierickx, G. Verhoef, J. Delabie, E.B. Smeland, P. Jares, A. Martinez, A. Lopez-Guillermo, E. Montserrat, E. Campo, R.M. Braziel, T.P. Miller, L.M. Rimsza, J.R. Cook, B. Pohlman, J. Sweetenham, R.R. Tubbs, R.I. Fisher, E. Hartmann, A. Rosenwald, G. Ott, H.K. Muller-Hermelink, D. Wrench, T.A. Lister, E.S. Jaffe, W.H. Wilson, W.C. Chan, L.M. Staudt, and P. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling. 2008. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 359:2313-2323.
- Li, B., and Q.P. Dou. 2000. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3850-3855.
- Liang, J., Y. Saad, T. Lei, J. Wang, D. Qi, Q. Yang, P.E. Kolattukudy, and M. Fu. 2010. MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *J Exp Med*. 207:2959-2973.
- Lin, H., and R. Grosschedl. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*. 376:263-267.
- Lin, T.S., A.S. Ruppert, A.J. Johnson, B. Fischer, N.A. Heerema, L.A. Andritsos, K.A. Blum, J.M. Flynn, J.A. Jones, W. Hu, M.E. Moran, S.M. Mitchell, L.L. Smith, A.J. Wagner, C.A. Raymond, L.J. Schaaf, M.A. Phelps, M.A. Villalona-Calero, M.R. Grever, and J.C. Byrd. 2009. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol*. 27:6012-6018.
- Liu, H., R. Buus, M.J. Clague, and S. Urbe. 2009. Regulation of ErbB2 receptor status by the proteasomal DUB POH1. *PLoS One*. 4:e5544.
- Liu, J., H.J. Chung, M. Vogt, Y. Jin, D. Malide, L. He, M. Dunder, and D. Levens. 2011. JTV1 co-activates FBP to induce USP29 transcription and stabilize p53 in response to oxidative stress. *EMBO J*. 30:846-858.
- Liu, N., C. Liu, X. Li, S. Liao, W. Song, C. Yang, C. Zhao, H. Huang, L. Guan, P. Zhang, S. Liu, X. Hua, X. Chen, P. Zhou, X. Lan, S. Yi, S. Wang, X. Wang, Q.P. Dou, and J. Liu. 2014. A novel proteasome inhibitor suppresses tumor growth via targeting both 19S proteasome deubiquitinases and 20S proteolytic peptidases. *Sci Rep*. 4:5240.
- Liu, Q., L. Alinari, C.S. Chen, F. Yan, J.T. Dalton, R. Lapalombella, X. Zhang, R. Mani, T. Lin, J.C. Byrd, R.A. Baiocchi, and N. Muthusamy. 2010. FTY720 shows promising in vitro and in vivo preclinical

- activity by downmodulating Cyclin D1 and phospho-Akt in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 16:3182-3192.
- Liu, Q., X. Zhao, F. Frizzera, Y. Ma, R. Santhanam, D. Jarjoura, A. Lehman, D. Perrotti, C.S. Chen, J.T. Dalton, N. Muthusamy, and J.C. Byrd. 2008. FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood.* 111:275-284.
- Liu, Y., S. Shoji-Kawata, R.M. Sumpter, Jr., Y. Wei, V. Ginet, L. Zhang, B. Posner, K.A. Tran, D.R. Green, R.J. Xavier, S.Y. Shaw, P.G. Clarke, J. Puyal, and B. Levine. 2013a. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:20364-20371.
- Liu, Z., S.M. Zanata, J. Kim, M.A. Peterson, D. Di Vizio, L.R. Chirieac, S. Pyne, M. Agostini, M.R. Freeman, and M. Loda. 2013b. The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation. *Oncogene.* 32:1660-1669.
- Lo, S.C., and M. Hannink. 2008. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res.* 314:1789-1803.
- Loeder, S., T. Zenz, A. Schnaiter, D. Mertens, D. Winkler, H. Dohner, K.M. Debatin, S. Stilgenbauer, and S. Fulda. 2009. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 69:8977-8986.
- Longo, P.G., L. Laurenti, S. Gobessi, S. Sica, G. Leone, and D.G. Efremov. 2008. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 111:846-855.
- Lui, T.T., C. Lacroix, S.M. Ahmed, S.J. Goldenberg, C.A. Leach, A.M. Daulat, and S. Angers. 2011. The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol.* 31:2053-2065.
- Maas, C., J.M. Tromp, J. van Laar, R. Thijssen, J.A. Elias, A. Malara, A. Krippner-Heidenreich, J. Silke, M.H. van Oers, and E. Eldering. 2013. CLL cells are resistant to smac mimetics because of an inability to form a ripoptosome complex. *Cell Death Dis.* 4:e782.
- MacFarlane, M., N. Harper, R.T. Snowden, M.J. Dyer, G.A. Barnett, J.H. Pringle, and G.M. Cohen. 2002. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene.* 21:6809-6818.
- Macias-Perez, I.M., and I.W. Flinn. 2013. GS-1101: a delta-specific PI3K inhibitor in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 8:22-27.
- Maertens, G.N., S. El Messaoudi-Aubert, S. Elderkin, K. Hiom, and G. Peters. 2010. Ubiquitin-specific proteases 7 and 11 modulate Polycomb regulation of the INK4a tumour suppressor. *EMBO J.* 29:2553-2565.
- Maffei, R., S. Martinelli, I. Castelli, R. Santachiara, P. Zucchini, M. Fontana, S. Fiorcari, G. Bonacorsi, F. Ilariucci, G. Torelli, and R. Marasca. 2010. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res.* 34:312-321.
- Magiera, M.M., S. Mora, B. Mojsa, I. Robbins, I. Lassot, and S. Desagher. 2013. Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons. *Cell Death Differ.* 20:281-292.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Fastrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas, and J. Lukas. 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell.* 131:887-900.
- Mainou-Fowler, T., and A.G. Prentice. 1996. Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 21:369-377.
- Maloum, K., C. Settegrana, E. Chapiro, B. Cazin, S. Lepretre, A. Delmer, M. Leporrier, B. Dreyfus, O. Tournilhac, B. Mahe, F. Nguyen-Khac, C. Lesty, F. Davi, and H. Merle-Beral. 2009. IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL

- patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide. *Ann Hematol.* 88:1215-1221.
- Mao, Y., F. Senic-Matuglia, P.P. Di Fiore, S. Polo, M.E. Hodsdon, and P. De Camilli. 2005. Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12700-12705.
- Masetti, R., M. Togni, A. Astolfi, M. Pigazzi, V. Indio, B. Rivalta, E. Manara, S. Rutella, G. Basso, A. Pession, and F. Locatelli. 2014. Whole transcriptome sequencing of a paediatric case of de novo acute myeloid leukaemia with del(5q) reveals RUNX1-USP42 and PRDM16-SKI fusion transcripts. *Br J Haematol.* 166:449-452.
- Massoumi, R. 2011. CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer. *Future Oncol.* 7:285-297.
- Matutes, E., K. Owusu-Ankomah, R. Morilla, J. Garcia Marco, A. Houlihan, T.H. Que, and D. Catovsky. 1994. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 8:1640-1645.
- Maurer, U., C. Charvet, A.S. Wagman, E. Dejardin, and D.R. Green. 2006. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell.* 21:749-760.
- Mazumdar, T., F.M. Gorgun, Y. Sha, A. Tyryshkin, S. Zeng, R. Hartmann-Petersen, J.P. Jorgensen, K.B. Hendil, and N.T. Eissa. 2010. Regulation of NF-kappaB activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:13854-13859.
- McNally, R.S., B.K. Davis, C.M. Clements, M.A. Accavitti-Loper, T.W. Mak, and J.P. Ting. 2011. DJ-1 enhances cell survival through the binding of Cezanne, a negative regulator of NF-kappaB. *J Biol Chem.* 286:4098-4106.
- Meads, M.B., R.A. Gatenby, and W.S. Dalton. 2009. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer.* 9:665-674.
- Mehling, M., T.A. Johnson, J. Antel, L. Kappos, and A. Bar-Or. 2011. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology.* 76:S20-27.
- Mei, Y., A.A. Hahn, S. Hu, and X. Yang. 2011. The USP19 deubiquitinase regulates the stability of c-IAP1 and c-IAP2. *J Biol Chem.* 286:35380-35387.
- Meijer, I.M., W. van Rotterdam, E.J. van Zoelen, and J.E. van Leeuwen. 2012. Recycling of EGFR and ErbB2 is associated with impaired Hrs tyrosine phosphorylation and decreased deubiquitination by AMSH. *Cell Signal.* 24:1981-1988.
- Menendez-Benito, V., L.G. Verhoef, M.G. Masucci, and N.P. Dantuma. 2005. Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet.* 14:2787-2799.
- Messick, T.E., N.S. Russell, A.J. Iwata, K.L. Sarachan, R. Shiekhattar, J.R. Shanks, F.E. Reyes-Turcu, K.D. Wilkinson, and R. Marmorstein. 2008. Structural basis for ubiquitin recognition by the Otu1 ovarian tumor domain protein. *J Biol Chem.* 283:11038-11049.
- Messmer, B.T., D. Messmer, S.L. Allen, J.E. Koltz, P. Kudalkar, D. Cesar, E.J. Murphy, P. Koduru, M. Ferrarini, S. Zupo, G. Cutrona, R.N. Damle, T. Wasil, K.R. Rai, M.K. Hellerstein, and N. Chiorazzi. 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 115:755-764.
- Metzger, M.B., and A.M. Weissman. 2010. Working on a chain: E3s ganging up for ubiquitylation. *Nat Cell Biol.* 12:1124-1126.
- Metzig, M., D. Nickles, C. Falschlehner, J. Lehmann-Koch, B.K. Straub, W. Roth, and M. Boutros. 2011. An RNAi screen identifies USP2 as a factor required for TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling. *Int J Cancer.* 129:607-618.

- Meuleman, N., B. Stamatopoulos, M. Dejeneffe, H. El Housni, L. Lagneaux, and D. Bron. 2008. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 22:1882-1890.
- Meyer, H.J., and M. Rape. 2014. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell*. 157:910-921.
- Meynet, O., B. Zunino, L. Happo, L.A. Pradelli, J. Chiche, M.A. Jacquin, L. Mondragon, J.F. Tanti, B. Taillan, G. Garnier, J. Reverso-Meinietti, N. Mounier, J.F. Michiels, E.M. Michalak, M. Carles, C.L. Scott, and J.E. Ricci. 2013. Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. *Blood*. 122:2402-2411.
- Mialki, R.K., J. Zhao, J. Wei, D.F. Mallampalli, and Y. Zhao. 2013. Overexpression of USP14 protease reduces I-kappaB protein levels and increases cytokine release in lung epithelial cells. *J Biol Chem*. 288:15437-15441.
- Micallef, I.N., M.J. Maurer, G.A. Wiseman, D.A. Nikcevich, P.J. Kurtin, M.W. Cannon, D.G. Perez, G.S. Soori, B.K. Link, T.M. Habermann, and T.E. Witzig. 2011. Epratuzumab with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 118:4053-4061.
- Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 114:181-190.
- Mines, M.A., J.S. Goodwin, L.E. Limbird, F.F. Cui, and G.H. Fan. 2009. Deubiquitination of CXCR4 by USP14 is critical for both CXCL12-induced CXCR4 degradation and chemotaxis but not ERK activation. *J Biol Chem*. 284:5742-5752.
- Mizushima, N., and M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 147:728-741.
- Mizushima, N., T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M.D. George, D.J. Klionsky, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 395:395-398.
- Mocsai, A., J. Ruland, and V.L. Tybulewicz. 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 10:387-402.
- Mohle, R., C. Failenschmid, F. Bautz, and L. Kanz. 1999. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*. 13:1954-1959.
- Mojsa, B., I. Lassot, and S. Desagher. 2014. Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. *Cells*. 3:418-437.
- Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 129:665-679.
- Monroe, J.G. 2006. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*. 6:283-294.
- Moreau, E.J., E. Matutes, R.P. A'Hern, A.M. Morilla, R.M. Morilla, K.A. Owusu-Ankomah, B.K. Seon, and D. Catovsky. 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 108:378-382.
- Morschhauser, F., J. Radford, A. Van Hoof, U. Vitolo, P. Soubeyran, H. Tilly, P.C. Huijgens, A. Kolstad, F. d'Amore, M. Gonzalez Diaz, M. Petrini, C. Sebban, P.L. Zinzani, M.H. van Oers, W. van Putten, A. Bischof-Delaloye, A. Rohatiner, G. Salles, J. Kuhlmann, and A. Hagenbeek. 2008. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 26:5156-5164.
- Mosesson, Y., G.B. Mills, and Y. Yarden. 2008. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer*. 8:835-850.
- Moskowitz, A. 2014. New frontiers for brentuximab vedotin for lymphomas. *Leuk Lymphoma*:1-4.
- Mott, J.L., S. Kobayashi, S.F. Bronk, and G.J. Gores. 2007. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 26:6133-6140.

- Moujalled, D.M., W.D. Cook, T. Okamoto, J. Murphy, K.E. Lawlor, J.E. Vince, and D.L. Vaux. 2013. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis.* 4:e465.
- Munoz-Pinedo, C., A. Guio-Carrion, J.C. Goldstein, P. Fitzgerald, D.D. Newmeyer, and D.R. Green. 2006. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11573-11578.
- Narendra, D., A. Tanaka, D.F. Suen, and R.J. Youle. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 183:795-803.
- Naujokat, C., and S. Hoffmann. 2002. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest.* 82:965-980.
- Nawrocki, S.T., J.S. Carew, K. Dunner, Jr., L.H. Boise, P.J. Chiao, P. Huang, J.L. Abbruzzese, and D.J. McConkey. 2005. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 65:11510-11519.
- Neutzner, M., and A. Neutzner. 2012. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays Biochem.* 52:37-50.
- Neviani, P., R. Santhanam, J.J. Oaks, A.M. Eiring, M. Notari, B.W. Blaser, S. Liu, R. Trotta, N. Muthusamy, C. Gambacorti-Passerini, B.J. Druker, J. Cortes, G. Marcucci, C.S. Chen, N.M. Verrills, D.C. Roy, M.A. Caligiuri, C.D. Bloomfield, J.C. Byrd, and D. Perrotti. 2007. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 117:2408-2421.
- Niendorf, S., A. Oksche, A. Kisser, J. Lohler, M. Prinz, H. Schorle, S. Feller, M. Lewitzky, I. Horak, and K.P. Knobeloch. 2007. Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Mol Cell Biol.* 27:5029-5039.
- Nifoussi, S.K., J.A. Vrana, A.M. Domina, A. De Biasio, J. Gui, M.A. Gregory, S.R. Hann, and R.W. Craig. 2012. Thr 163 phosphorylation causes Mcl-1 stabilization when degradation is independent of the adjacent GSK3-targeted phosphodegron, promoting drug resistance in cancer. *PLoS One.* 7:e47060.
- Nihiro, H., and E.A. Clark. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol.* 2:945-956.
- Nijman, S.M., M.P. Luna-Vargas, A. Velds, T.R. Brummelkamp, A.M. Dirac, T.K. Sixma, and R. Bernards. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell.* 123:773-786.
- Nikrad, M., T. Johnson, H. Puthalalath, L. Coultas, J. Adams, and A.S. Kraft. 2005. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther.* 4:443-449.
- Nishio, M., T. Endo, N. Tsukada, J. Ohata, S. Kitada, J.C. Reed, N.J. Zvaifler, and T.J. Kipps. 2005. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood.* 106:1012-1020.
- Nutt, S.L., and B.L. Kee. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity.* 26:715-725.
- O'Brien, S., J.O. Moore, T.E. Boyd, L.M. Larratt, A.B. Skotnicki, B. Koziner, A.A. Chanan-Khan, J.F. Seymour, J. Gribben, L.M. Itri, and K.R. Rai. 2009a. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol.* 27:5208-5212.
- O'Brien, S.M., D.F. Claxton, M. Crump, S. Faderl, T. Kipps, M.J. Keating, J. Viallet, and B.D. Cheson. 2009b. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 113:299-305.
- O'Neil, J., J. Grim, P. Strack, S. Rao, D. Tibbitts, C. Winter, J. Hardwick, M. Welcker, J.P. Meijerink, R. Pieters, G. Draetta, R. Sears, B.E. Clurman, and A.T. Look. 2007. FBW7 mutations in leukemic cells

- mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*. 204:1813-1824.
- Oaks, J.J., R. Santhanam, C.J. Walker, S. Roof, J.G. Harb, G. Ferencik, A.K. Einfeld, J.R. Van Brocklyn, R. Briesewitz, S.A. Saddoughi, K. Nagata, R. Bittman, M.A. Caligiuri, O. Abdel-Wahab, R. Levine, R.B. Arlinghaus, A. Quintas-Cardama, J.M. Goldman, J. Apperley, A. Reid, D. Milojkovic, M.T. Ziolo, G. Marcucci, B. Ogretmen, P. Neviani, and D. Perrotti. 2013. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood*. 122:1923-1934.
- Oettinger, M.A., D.G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 248:1517-1523.
- Ogretmen, B., and Y.A. Hannun. 2004. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*. 4:604-616.
- Ohnishi, K., and F. Melchers. 2003. The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol*. 4:849-856.
- Oliveira, A.M., M.M. Chou, A.R. Perez-Atayde, and A.E. Rosenberg. 2006. Aneurysmal bone cyst: a neoplasm driven by upregulation of the USP6 oncogene. *J Clin Oncol*. 24:e1; author reply e2.
- Oppezzo, P., Y. Vasconcelos, C. Settegrana, D. Jeannel, F. Vuillier, M. Legarff-Tavernier, E.Y. Kimura, S. Bechet, G. Dumas, M. Brissard, H. Merle-Beral, M. Yamamoto, G. Dighiero, and F. Davi. 2005. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 106:650-657.
- Oppliger Leibundgut, E., D. Rogenmoser-Dissler, D. de Beer, N.A. Porret, S. Zibellini, J. Durig, A. Roth, D. Klingbiel, and G.M. Baerlocher. 2012. CLLU1 expression distinguishes chronic lymphocytic leukemia from other mature B-cell neoplasms. *Leuk Res*. 36:1204-1207.
- Orchard, J.A., R.E. Ibbotson, Z. Davis, A. Wiestner, A. Rosenwald, P.W. Thomas, T.J. Hamblin, L.M. Staudt, and D.G. Oscier. 2004. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 363:105-111.
- Ordureau, A., H. Smith, M. Windheim, M. Peggie, E. Carrick, N. Morrice, and P. Cohen. 2008. The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem J*. 409:43-52.
- Oscier, D.G., E. Matutes, A. Copplestone, R.M. Pickering, R. Chapman, R. Gillingham, D. Catovsky, and T.J. Hamblin. 1997. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol*. 98:934-939.
- Otera, H., and K. Mihara. 2011. Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases*. 2:167-172.
- Packham, G., and F.K. Stevenson. 2005. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 114:441-449.
- Pal, A., M.A. Young, and N.J. Donato. 2014. Emerging Potential of Therapeutic Targeting of Ubiquitin-Specific Proteases in the Treatment of Cancer. *Cancer Res*. 74:4955-4966.
- Pallasch, C.P., A. Schulz, N. Kutsch, J. Schwamb, S. Hagist, H. Kashkar, A. Ultsch, C. Wickenhauser, M. Hallek, and C.M. Wendtner. 2008. Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood*. 112:4213-4219.
- Panayiotidis, P., D. Jones, K. Ganeshaguru, L. Foroni, and A.V. Hoffbrand. 1996. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 92:97-103.
- Park, Y.Y., S. Lee, M. Karbowski, A. Neutzner, R.J. Youle, and H. Cho. 2010. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci*. 123:619-626.

- Parsons, J.L., Dianova, I.I., S.V. Khoronenkova, M.J. Edelman, B.M. Kessler, and G.L. Dianov. 2011. USP47 is a deubiquitylating enzyme that regulates base excision repair by controlling steady-state levels of DNA polymerase beta. *Mol Cell*. 41:609-615.
- Patten, P.E., A.G. Buggins, J. Richards, A. Wotherspoon, J. Salisbury, G.J. Mufti, T.J. Hamblin, and S. Devereux. 2008. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 111:5173-5181.
- Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X.H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M.D. Schneider, and B. Levine. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 122:927-939.
- Pchejetski, D., T. Bohler, L. Brizuela, L. Sauer, N. Doumerc, M. Golzio, V. Salunkhe, J. Teissie, B. Malavaud, J. Waxman, and O. Cuvillier. 2010. FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer Res*. 70:8651-8661.
- Pedersen, I.M., S. Kitada, L.M. Leoni, J.M. Zapata, J.G. Karras, N. Tsukada, T.J. Kipps, Y.S. Choi, F. Bennett, and J.C. Reed. 2002. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. 100:1795-1801.
- Pelzer, C., I. Kassner, K. Matentzoglou, R.K. Singh, H.P. Wollscheid, M. Scheffner, G. Schmidtke, and M. Groettrup. 2007. UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem*. 282:23010-23014.
- Pepper, C., T. Hoy, and P. Bentley. 1998. Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance. *Leuk Lymphoma*. 28:355-361.
- Pepper, C., T.T. Lin, G. Pratt, S. Hewamana, P. Brennan, L. Hiller, R. Hills, R. Ward, J. Starczynski, B. Austen, L. Hooper, T. Stankovic, and C. Fegan. 2008. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 112:3807-3817.
- Pereg, Y., B.Y. Liu, K.M. O'Rourke, M. Sagolla, A. Dey, L. Komuves, D.M. French, and V.M. Dixit. 2010. Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat Cell Biol*. 12:400-406.
- Perez-Mancera, P.A., A.G. Rust, L. van der Weyden, G. Kristiansen, A. Li, A.L. Sarver, K.A. Silverstein, R. Grutzmann, D. Aust, P. Rummele, T. Knosel, C. Herd, D.L. Stemple, R. Kettleborough, J.A. Brosnan, A. Li, R. Morgan, S. Knight, J. Yu, S. Stegeman, L.S. Collier, J.J. ten Hoeve, J. de Ridder, A.P. Klein, M. Goggins, R.H. Hruban, D.K. Chang, A.V. Biankin, S.M. Grimmond, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, L.F. Wessels, S.A. Wood, C.A. Iacobuzio-Donahue, C. Pilarsky, D.A. Largaespada, D.J. Adams, and D.A. Tuveson. 2012. The deubiquitinase USP9X suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature*. 486:266-270.
- Peth, A., H.C. Besche, and A.L. Goldberg. 2009. Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol Cell*. 36:794-804.
- Philippen, A., S. Diener, T. Zenz, H. Dohner, S. Stilgenbauer, and D. Mertens. 2010. SYK carries no activating point mutations in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol*. 150:633-636.
- Pierce, S.K. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol*. 2:96-105.
- Pillai, S., and A. Cariappa. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 9:767-777.
- Pitman, M.R., J.M. Woodcock, A.F. Lopez, and S.M. Pitson. 2012. Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *Current molecular medicine*. 12:1207-1219.
- Pitson, S.M., J.A. Powell, and C.S. Bonder. 2011. Regulation of sphingosine kinase in hematological malignancies and other cancers. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 11:799-809.

- Planelles, L., S. Castillo-Gutierrez, J.P. Medema, A. Morales-Luque, H. Merle-Beral, and M. Hahne. 2007. APRIL but not BlyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival. *Haematologica*. 92:1284-1285.
- Podar, K., S.L. Gouill, J. Zhang, J.T. Opferman, E. Zorn, Y.T. Tai, T. Hideshima, M. Amiot, D. Chauhan, J.L. Harousseau, and K.C. Anderson. 2008. A pivotal role for Mcl-1 in Bortezomib-induced apoptosis. *Oncogene*. 27:721-731.
- Poggi, A., C. Prevosto, S. Catellani, I. Rocco, A. Garuti, and M.R. Zocchi. 2010. Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 151:252-264.
- Poncet, D., A. Belleville, C. t'kint de Roodenbeke, A. Roborel de Climens, E. Ben Simon, H. Merle-Beral, E. Callet-Bauchu, G. Salles, L. Sabatier, J. Delic, and E. Gilson. 2008. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 111:2388-2391.
- Ponzoni, M., C. Doglioni, and F. Caligaris-Cappio. 2011. Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin Diagn Pathol*. 28:161-166.
- Proto-Siqueira, R., R.A. Panepucci, F.P. Careta, A. Lee, A. Clear, K. Morris, C. Owen, E.G. Rizzatti, W.A. Silva, Jr., R.P. Falcao, M.A. Zago, and J.G. Gribben. 2008. SAGE analysis demonstrates increased expression of TOSO contributing to Fas-mediated resistance in CLL. *Blood*. 112:394-397.
- Rai, K.R., A. Sawitsky, E.P. Cronkite, A.D. Chanana, R.N. Levy, and B.S. Pasternack. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 46:219-234.
- Rainbolt, T.K., J.M. Saunders, and R.L. Wiseman. 2014. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 25:528-537.
- Rajkumar, S.V., P.G. Richardson, T. Hideshima, and K.C. Anderson. 2005. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol*. 23:630-639.
- Ramsay, A.G., A.J. Clear, R. Fatah, and J.G. Gribben. 2012. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 120:1412-1421.
- Ramsay, A.G., A.J. Johnson, A.M. Lee, G. Gorgun, R. Le Dieu, W. Blum, J.C. Byrd, and J.G. Gribben. 2008. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 118:2427-2437.
- Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. 15:707-747.
- Rassenti, L.Z., L. Huynh, T.L. Toy, L. Chen, M.J. Keating, J.G. Gribben, D.S. Neuberg, I.W. Flinn, K.R. Rai, J.C. Byrd, N.E. Kay, A. Greaves, A. Weiss, and T.J. Kipps. 2004. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 351:893-901.
- Rassenti, L.Z., S. Jain, M.J. Keating, W.G. Wierda, M.R. Grever, J.C. Byrd, N.E. Kay, J.R. Brown, J.G. Gribben, D.S. Neuberg, F. He, A.W. Greaves, K.R. Rai, and T.J. Kipps. 2008. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 112:1923-1930.
- Rebora, P., M. Lee, K. Czene, M.G. Valsecchi, and M. Reilly. 2012. High risks of familial chronic lymphatic leukemia for specific relatives: signposts for genetic discovery? *Leukemia*. 26:2419-2421.
- Reed, J.C. 1998. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 25:11-18.
- Reed, J.C. 2008. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*. 111:3322-3330.

- Reyes-Turcu, F.E., K.H. Ventii, and K.D. Wilkinson. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem.* 78:363-397.
- Richardson, S.J., C. Matthews, M.A. Catherwood, H.D. Alexander, B.S. Carey, J. Farrugia, A. Gardiner, S. Mould, D. Oscier, J.A. Copplestone, and A.G. Prentice. 2006. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood.* 107:3584-3592.
- Rickert, R.C. 2013. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol.* 13:578-591.
- Robak, T., K. Jamrozik, J. Gora-Tybor, B. Stella-Holowiecka, L. Konopka, B. Ceglarek, K. Warzocha, I. Seferynska, J. Piszcz, M. Calbecka, A. Kostyra, J. Dwilewicz-Trojaczek, A. Dmoszynska, K. Zawilska, A. Hellmann, A. Zdunczyk, S. Potoczek, M. Piotrowska, K. Lewandowski, and J.Z. Blonski. 2010. Comparison of cladribine plus cyclophosphamide with fludarabine plus cyclophosphamide as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia: a phase III randomized study by the Polish Adult Leukemia Group (PALG-CLL3 Study). *J Clin Oncol.* 28:1863-1869.
- Robak, T., P. Smolewski, B. Cebula, O. Grzybowska-Izydorczyk, and J.Z. Blonski. 2007. Rituximab plus cladribine with or without cyclophosphamide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 79:107-113.
- Roberts, A.W., J.F. Seymour, J.R. Brown, W.G. Wierda, T.J. Kipps, S.L. Khaw, D.A. Carney, S.Z. He, D.C. Huang, H. Xiong, Y. Cui, T.A. Busman, E.M. McKeegan, A.P. Krivoshik, S.H. Enschede, and R. Humerickhouse. 2012. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol.* 30:488-496.
- Robles, A.I., M.H. Wright, B. Gandhi, S.S. Feis, C.L. Hanigan, A. Wiestner, and L. Varticovski. 2006. Schedule-dependent synergy between the heat shock protein 90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin and doxorubicin restores apoptosis to p53-mutant lymphoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 12:6547-6556.
- Rock, K.L., and A.L. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol.* 17:739-779.
- Rolli, V., M. Gallwitz, T. Wossning, A. Flemming, W.W. Schamel, C. Zurn, and M. Reth. 2002. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell.* 10:1057-1069.
- Rosenwald, A., A.A. Alizadeh, G. Widhopf, R. Simon, R.E. Davis, X. Yu, L. Yang, O.K. Pickeral, L.Z. Rassenti, J. Powell, D. Botstein, J.C. Byrd, M.R. Grever, B.D. Cheson, N. Chiorazzi, W.H. Wilson, T.J. Kipps, P.O. Brown, and L.M. Staudt. 2001. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 194:1639-1647.
- Rossi, D., C. Ciardullo, V. Spina, and G. Gaidano. 2013. Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunol Lett.* 155:51-55.
- Rossi, D., M. Fangazio, S. Rasi, T. Vaisitti, S. Monti, S. Cresta, S. Chiaretti, I. Del Giudice, G. Fabbri, A. Bruscatto, V. Spina, C. Deambroggi, M. Marinelli, R. Fama, M. Greco, G. Daniele, F. Forconi, V. Gattei, F. Bertoni, S. Deaglio, L. Pasqualucci, A. Guarini, R. Dalla-Favera, R. Foa, and G. Gaidano. 2012a. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 119:2854-2862.
- Rossi, D., S. Rasi, G. Fabbri, V. Spina, M. Fangazio, F. Forconi, R. Marasca, L. Laurenti, A. Bruscatto, M. Cerri, S. Monti, S. Cresta, R. Fama, L. De Paoli, P. Bulian, V. Gattei, A. Guarini, S. Deaglio, D. Capello, R. Rabadan, L. Pasqualucci, R. Dalla-Favera, R. Foa, and G. Gaidano. 2012b. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 119:521-529.
- Rozman, C., and E. Montserrat. 1995. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 333:1052-1057.

- Ruan, J., E. Hyjek, P. Kermani, P.J. Christos, A.T. Hooper, M. Coleman, B. Hempstead, J.P. Leonard, A. Chadburn, and S. Rafii. 2006. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 12:5622-5631.
- Ruland, J., and T.W. Mak. 2003. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev.* 193:93-100.
- Sacco, J.J., J.M. Coulson, M.J. Clague, and S. Urbe. 2010. Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways. *IUBMB Life.* 62:140-157.
- Saddoughi, S.A., S. Gencer, Y.K. Peterson, K.E. Ward, A. Mukhopadhyay, J. Oaks, J. Bielawski, Z.M. Szulc, R.J. Thomas, S.P. Selvam, C.E. Senkal, E. Garrett-Mayer, R.M. De Palma, D. Fedarovich, A. Liu, A.A. Habib, R.V. Stahelin, D. Perrotti, and B. Ogretmen. 2013. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO molecular medicine.* 5:105-121.
- Sato, Y., A. Yoshikawa, A. Yamagata, H. Mimura, M. Yamashita, K. Ookata, O. Nureki, K. Iwai, M. Komada, and S. Fukai. 2008. Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature.* 455:358-362.
- Saxena, A., S. Viswanathan, O. Moshynska, P. Tandon, K. Sankaran, and D.P. Sheridan. 2004. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 75:22-33.
- Scarfo, L., and P. Ghia. 2013. Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immunol Lett.* 155:36-39.
- Schmid, C., and P.G. Isaacson. 1994. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology.* 24:445-451.
- Schmitz, R., R.M. Young, M. Ceribelli, S. Jhavar, W. Xiao, M. Zhang, G. Wright, A.L. Shaffer, D.J. Hodson, E. Buras, X. Liu, J. Powell, Y. Yang, W. Xu, H. Zhao, H. Kohlhammer, A. Rosenwald, P. Kluijn, H.K. Muller-Hermelink, G. Ott, R.D. Gascoyne, J.M. Connors, L.M. Rimsza, E. Campo, E.S. Jaffe, J. Delabie, E.B. Smeland, M.D. Olgwang, S.J. Reynolds, R.I. Fisher, R.M. Braziel, R.R. Tubbs, J.R. Cook, D.D. Weisenburger, W.C. Chan, S. Pittaluga, W. Wilson, T.A. Waldmann, M. Rowe, S.M. Mbulaiteye, A.B. Rickinson, and L.M. Staudt. 2012. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature.* 490:116-120.
- Schoenfeld, A.R., S. Apgar, G. Dolios, R. Wang, and S.A. Aaronson. 2004. BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 24:7444-7455.
- Schroers, R., F. Griesinger, L. Trumper, D. Haase, B. Kulle, L. Klein-Hitpass, L. Sellmann, U. Duhren, and J. Durig. 2005. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 19:750-758.
- Schulman, B.A., and J.W. Harper. 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:319-331.
- Schwamb, J., V. Feldhaus, M. Baumann, M. Patz, S. Brodesser, R. Brinker, J. Claasen, C.P. Pallasch, M. Hallek, C.M. Wendtner, and L.P. Frenzel. 2012. B-cell receptor triggers drug sensitivity of primary CLL cells by controlling glucosylation of ceramides. *Blood.* 120:3978-3985.
- Schweichel, J.U., and H.J. Merker. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 7:253-266.
- Schweitzer, K., P.M. Bozko, W. Dubiel, and M. Naumann. 2007. CSN controls NF-kappaB by deubiquitylation of IkappaBalpha. *EMBO J.* 26:1532-1541.
- Schwickart, M., X. Huang, J.R. Lill, J. Liu, R. Ferrando, D.M. French, H. Maecker, K. O'Rourke, F. Bazan, J. Eastham-Anderson, P. Yue, D. Dornan, D.C. Huang, and V.M. Dixit. 2010. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature.* 463:103-107.

- Seki, R., K. Ohshima, K. Nagafuji, T. Fujisaki, N. Uike, F. Kawano, H. Gondo, S. Makino, T. Eto, Y. Moriuchi, F. Taguchi, T. Kamimura, H. Tsuda, R. Ogawa, K. Shimoda, K. Yamashita, K. Suzuki, H. Suzushima, K. Tsukazaki, M. Higuchi, A. Utsunomiya, M. Iwahashi, Y. Imamura, K. Tamura, J. Suzumiya, M. Yoshida, Y. Abe, T. Matsumoto, and T. Okamura. 2010. Rituximab in combination with CHOP chemotherapy for the treatment of diffuse large B cell lymphoma in Japan: a retrospective analysis of 1,057 cases from Kyushu Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 91:258-266.
- Sekulic, A., C.C. Hudson, J.L. Homme, P. Yin, D.M. Otterness, L.M. Karnitz, and R.T. Abraham. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 60:3504-3513.
- Serrano, D., J. Monteiro, S.L. Allen, J. Koltz, P. Schulman, S.M. Lichtman, A. Buchbinder, V.P. Vinciguerra, N. Chiorazzi, and P.K. Gregersen. 1997. Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 158:1482-1489.
- Shaffer, A.L., A. Rosenwald, and L.M. Staudt. 2002. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2:920-932.
- Shain, K.H., and J. Tao. 2014. The B-cell receptor orchestrates environment-mediated lymphoma survival and drug resistance in B-cell malignancies. *Oncogene.* 33:4107-4113.
- Shan, J., W. Zhao, and W. Gu. 2009. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Mol Cell.* 36:469-476.
- Shan, X., M.J. Czar, S.C. Bunnell, P. Liu, Y. Liu, P.L. Schwartzberg, and R.L. Wange. 2000. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol.* 20:6945-6957.
- Shanafelt, T.D., T.E. Witzig, S.R. Fink, R.B. Jenkins, S.F. Paternoster, S.A. Smoley, K.J. Stockero, D.M. Nast, H.C. Flynn, R.C. Tschumper, S. Geyer, C.S. Zent, T.G. Call, D.F. Jelinek, N.E. Kay, and G.W. Dewald. 2006. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 24:4634-4641.
- Shankland, K.R., J.O. Armitage, and B.W. Hancock. 2012. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 380:848-857.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C.B. Thompson, and Y. Tsujimoto. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 6:1221-1228.
- Shinohara, H., T. Yasuda, Y. Aiba, H. Sanjo, M. Hamadate, H. Watarai, H. Sakurai, and T. Kurosaki. 2005. PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J Exp Med.* 202:1423-1431.
- Shringarpure, R., L. Catley, D. Bhole, R. Burger, K. Podar, Y.T. Tai, B. Kessler, P. Galaray, H. Ploegh, P. Tassone, T. Hideshima, C. Mitsiades, N.C. Munshi, D. Chauhan, and K.C. Anderson. 2006. Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br J Haematol.* 134:145-156.
- Smith, A.J., H. Dai, C. Correia, R. Takahashi, S.H. Lee, I. Schmitz, and S.H. Kaufmann. 2011. Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *J Biol Chem.* 286:17682-17692.
- Sobhian, B., G. Shao, D.R. Lilli, A.C. Culhane, L.A. Moreau, B. Xia, D.M. Livingston, and R.A. Greenberg. 2007. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science.* 316:1198-1202.
- Soma, L.A., F.E. Craig, and S.H. Swerdlow. 2006. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol.* 37:152-159.
- Stamatopoulos, B., N. Meuleman, C. De Bruyn, K. Pieters, P. Mineur, C. Le Roy, S. Saint-Georges, N. Varin-Blank, F. Cymbalista, D. Bron, and L. Lagneaux. 2012. AMD3100 disrupts the cross-talk between

- chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica*. 97:608-615.
- Stegmeier, F., M. Rape, V.M. Draviam, G. Nalepa, M.E. Sowa, X.L. Ang, E.R. McDonald, 3rd, M.Z. Li, G.J. Hannon, P.K. Sorger, M.W. Kirschner, J.W. Harper, and S.J. Elledge. 2007a. Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature*. 446:876-881.
- Stegmeier, F., M.E. Sowa, G. Nalepa, S.P. Gygi, J.W. Harper, and S.J. Elledge. 2007b. The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:8869-8874.
- Stevenson, F.K., S. Krysov, A.J. Davies, A.J. Steele, and G. Packham. 2011. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 118:4313-4320.
- Stevenson, L.F., A. Sparks, N. Allende-Vega, D.P. Xirodimas, D.P. Lane, and M.K. Saville. 2007. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *EMBO J*. 26:976-986.
- Stilgenbauer, S., L. Bullinger, A. Benner, K. Wildenberger, M. Bentz, K. Dohner, A.D. Ho, P. Lichter, and H. Dohner. 1999. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 13:1331-1334.
- Stilgenbauer, S., T. Zenz, D. Winkler, A. Buhler, R.F. Schlenk, S. Groner, R. Busch, M. Hensel, U. Duhrsen, J. Finke, P. Dreger, U. Jager, E. Lengfelder, K. Hohloch, U. Soling, R. Schlag, M. Kneba, M. Hallek, and H. Dohner. 2009. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 27:3994-4001.
- Stoffel, A. 2005. The NF-kappaB signalling pathway: a therapeutic target in lymphoid malignancies? *Expert Opin Ther Targets*. 9:1045-1061.
- Sun, X.X., and M.S. Dai. 2014. Deubiquitinating enzyme regulation of the p53 pathway: A lesson from Otub1. *World J Biol Chem*. 5:75-84.
- Sung, K.W., J. Choi, Y.K. Hwang, S.J. Lee, H.J. Kim, J.Y. Kim, E.J. Cho, K.H. Yoo, and H.H. Koo. 2009. Overexpression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is an independent unfavorable prognostic factor in childhood de novo acute myeloid leukemia. *J Korean Med Sci*. 24:605-613.
- Taherbhoy, A.M., B.A. Schulman, and S.E. Kaiser. 2012. Ubiquitin-like modifiers. *Essays Biochem*. 52:51-63.
- Tait, S.W., and D.R. Green. 2008. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*. 27:6452-6461.
- Tait, S.W., G. Ichim, and D.R. Green. 2014. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*. 127:2135-2144.
- Tait, S.W., A. Oberst, G. Quarato, S. Milasta, M. Haller, R. Wang, M. Karvela, G. Ichim, N. Yatim, M.L. Albert, G. Kidd, R. Wakefield, S. Frase, S. Krautwald, A. Linkermann, and D.R. Green. 2013. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep*. 5:878-885.
- Takata, M., H. Sabe, A. Hata, T. Inazu, Y. Homma, T. Nukada, H. Yamamura, and T. Kurosaki. 1994. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J*. 13:1341-1349.
- Tamm, I., S. Richter, D. Oltersdorf, U. Creutzig, J. Harbott, F. Scholz, L. Karawajew, W.D. Ludwig, and C. Wuchter. 2004. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 10:3737-3744.
- Tauriello, D.V., A. Haegebarth, I. Kuper, M.J. Edelmann, M. Henraat, M.R. Canninga-van Dijk, B.M. Kessler, H. Clevers, and M.M. Maurice. 2010. Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. *Mol Cell*. 37:607-619.

- ten Hacken, E., and J.A. Burger. 2014. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res.* 20:548-556.
- Thomas, L.W., C. Lam, and S.W. Edwards. 2010. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* 584:2981-2989.
- Thrower, J.S., L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C.M. Pickart. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19:94-102.
- Tian, Z., P. D'Arcy, X. Wang, A. Ray, Y.T. Tai, Y. Hu, R.D. Carrasco, P. Richardson, S. Linder, D. Chauhan, and K.C. Anderson. 2014. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood.* 123:706-716.
- Ticchioni, M., M. Essafi, P.Y. Jeandel, F. Davi, J.P. Cassuto, M. Deckert, and A. Bernard. 2007. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene.* 26:7081-7091.
- Tran, H., F. Hamada, T. Schwarz-Romond, and M. Bienz. 2008. Trabid, a new positive regulator of Wnt-induced transcription with preference for binding and cleaving K63-linked ubiquitin chains. *Genes Dev.* 22:528-542.
- Trentin, L., A. Cabrelle, M. Facco, D. Carollo, M. Miorin, A. Tosoni, P. Pizzo, G. Binotto, L. Nicolardi, R. Zambello, F. Adami, C. Agostini, and G. Semenzato. 2004. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 104:502-508.
- Trivigno, D., F. Essmann, S.M. Huber, and J. Rudner. 2012. Deubiquitinase USP9x confers radioresistance through stabilization of Mcl-1. *Neoplasia.* 14:893-904.
- Tsukada, N., J.A. Burger, N.J. Zvaifler, and T.J. Kipps. 2002. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 99:1030-1037.
- Turner, M., E. Schweighoffer, F. Colucci, J.P. Di Santo, and V.L. Tybulewicz. 2000. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today.* 21:148-154.
- Tzimas, C., G. Michailidou, M. Arsenakis, E. Kieff, G. Mosialos, and E.G. Hatzivassiliou. 2006. Human ubiquitin specific protease 31 is a deubiquitinating enzyme implicated in activation of nuclear factor-kappaB. *Cell Signal.* 18:83-92.
- Ullio, C., J. Casas, U.T. Brunk, G. Sala, G. Fabrias, R. Ghidoni, G. Bonelli, F.M. Baccino, and R. Autelli. 2012. Sphingosine mediates TNFalpha-induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells. *Journal of lipid research.* 53:1134-1143.
- Van Bockstaele, F., B. Verhasselt, and J. Philippe. 2009. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 23:25-47.
- van Leuken, R.J., M.P. Luna-Vargas, T.K. Sixma, R.M. Wolthuis, and R.H. Medema. 2008. Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls mRNA-levels of aurora B. *Cell Cycle.* 7:2710-2719.
- van Meeteren, L.A., V. Brinkmann, J.S. Saulnier-Blache, K.R. Lynch, and W.H. Moolenaar. 2008. Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett.* 266:203-208.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:700-714.
- Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, P. Bogaert, B. Laukens, K. Zobel, K. Deshayes, D. Vucic, S. Fulda, P. Vandenabeele, and M.J. Bertrand. 2011. cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ.* 18:656-665.
- Vasconcelos, Y., J. De Vos, L. Vallat, T. Reme, A.I. Lalanne, K. Wanherdrick, A. Michel, F. Nguyen-Khac, P. Oppezco, C. Magnac, K. Maloum, F. Ajchenbaum-Cymbalista, X. Troussard, M. Leporrier, B. Klein, G. Dighiero, and F. Davi. 2005. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can

- discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. *Leukemia*. 19:2002-2005.
- Ventii, K.H., and K.D. Wilkinson. 2008. Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J*. 414:161-175.
- Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, E.V. Koonin, and R.J. Deshaies. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. 298:611-615.
- Waldele, K., K. Silbermann, G. Schneider, T. Ruckes, B.R. Cullen, and R. Grassmann. 2006. Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood*. 107:4491-4499.
- Wallington-Beddoe, C.T., J. Hewson, K.F. Bradstock, and L.J. Bendall. 2011. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. *Autophagy*. 7:707-715.
- Walsh, S.H., and R. Rosenquist. 2005. Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Med Oncol*. 22:327-341.
- Wang, B., M. Xie, R. Li, T.K. Owonikoko, S.S. Ramalingam, F.R. Khuri, W.J. Curran, Y. Wang, and X. Deng. 2014a. Role of Ku70 in deubiquitination of Mcl-1 and suppression of apoptosis. *Cell Death Differ*. 21:1160-1169.
- Wang, C.L., J.Y. Wang, Z.Y. Liu, X.M. Ma, X.W. Wang, H. Jin, X.P. Zhang, D. Fu, L.J. Hou, and Y.C. Lu. 2014b. Ubiquitin-specific protease 2a stabilizes MDM4 and facilitates the p53-mediated intrinsic apoptotic pathway in glioblastoma. *Carcinogenesis*. 35:1500-1509.
- Wang, H., P. Song, L. Du, W. Tian, W. Yue, M. Liu, D. Li, B. Wang, Y. Zhu, C. Cao, J. Zhou, and Q. Chen. 2011a. Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem*. 286:11649-11658.
- Wang, L., F. Du, and X. Wang. 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 133:693-703.
- Wang, L., M.S. Lawrence, Y. Wan, P. Stojanov, C. Sougnez, K. Stevenson, L. Werner, A. Sivachenko, D.S. DeLuca, L. Zhang, W. Zhang, A.R. Vartanov, S.M. Fernandes, N.R. Goldstein, E.G. Folco, K. Cibulskis, B. Tesar, Q.L. Sievers, E. Shefler, S. Gabriel, N. Hacohen, R. Reed, M. Meyerson, T.R. Golub, E.S. Lander, D. Neuberg, J.R. Brown, G. Getz, and C.J. Wu. 2011b. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 365:2497-2506.
- Wang, M.L., S. Rule, P. Martin, A. Goy, R. Auer, B.S. Kahl, W. Jurczak, R.H. Advani, J.E. Romaguera, M.E. Williams, J.C. Barrientos, E. Chmielowska, J. Radford, S. Stilgenbauer, M. Dreyling, W.W. Jedrzejczak, P. Johnson, S.E. Spurgeon, L. Li, L. Zhang, K. Newberry, Z. Ou, N. Cheng, B. Fang, J. McGreivy, F. Clow, J.J. Buggy, B.Y. Chang, D.M. Beaupre, L.A. Kunkel, and K.A. Blum. 2013. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 369:507-516.
- Wang, Z., H. Jiang, S. Chen, F. Du, and X. Wang. 2012. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*. 148:228-243.
- Weake, V.M., and J.L. Workman. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*. 29:653-663.
- Weidberg, H., E. Shvets, and Z. Elazar. 2011. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*. 80:125-156.
- Weissman, A.M., N. Shabek, and A. Ciechanover. 2011. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:605-620.
- Westermann, B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:872-884.

- Widhopf, G.F., 2nd, L.Z. Rassenti, T.L. Toy, J.G. Gribben, W.G. Wierda, and T.J. Kipps. 2004. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. 104:2499-2504.
- Wienands, J., O. Larbolette, and M. Reth. 1996. Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:7865-7870.
- Wiestner, A., A. Rosenwald, T.S. Barry, G. Wright, R.E. Davis, S.E. Henrickson, H. Zhao, R.E. Ibbotson, J.A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D.C. Arthur, G.E. Marti, W.H. Wilson, T.J. Hamblin, D.G. Oscier, and L.M. Staudt. 2003. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 101:4944-4951.
- Wilkinson, K.D. 1997. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*. 11:1245-1256.
- Wilkinson, K.D., E. Laleli-Sahin, J. Urbauer, C.N. Larsen, G.H. Shih, A.L. Haas, S.T. Walsh, and A.J. Wand. 1999. The binding site for UCH-L3 on ubiquitin: mutagenesis and NMR studies on the complex between ubiquitin and UCH-L3. *J Mol Biol*. 291:1067-1077.
- Williams, S.A., and D.J. McConkey. 2003. The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer Res*. 63:7338-7344.
- Winborn, B.J., S.M. Travis, S.V. Todi, K.M. Scaglione, P. Xu, A.J. Williams, R.E. Cohen, J. Peng, and H.L. Paulson. 2008. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem*. 283:26436-26443.
- Wossning, T., S. Herzog, F. Kohler, S. Meixlsperger, Y. Kulathu, G. Mittler, A. Abe, U. Fuchs, A. Borkhardt, and H. Jumaa. 2006. Deregulated Syk inhibits differentiation and induces growth factor-independent proliferation of pre-B cells. *J Exp Med*. 203:2829-2840.
- Wu, N., C. Liu, C. Bai, Y.P. Han, W.C. Cho, and Q. Li. 2013. Over-Expression of Deubiquitinating Enzyme USP14 in Lung Adenocarcinoma Promotes Proliferation through the Accumulation of beta-Catenin. *International journal of molecular sciences*. 14:10749-10760.
- Xu, G., X. Tan, H. Wang, W. Sun, Y. Shi, S. Burlingame, X. Gu, G. Cao, T. Zhang, J. Qin, and J. Yang. 2010. Ubiquitin-specific peptidase 21 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor kappaB activation via binding to and deubiquitinating receptor-interacting protein 1. *J Biol Chem*. 285:969-978.
- Xu, P., D.M. Duong, N.T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, and J. Peng. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*. 137:133-145.
- Yadav, R.K., S.W. Chae, H.R. Kim, and H.J. Chae. 2014. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *Journal of cancer prevention*. 19:75-88.
- Yamaguchi, T., J. Kimura, Y. Miki, and K. Yoshida. 2007. The deubiquitinating enzyme USP11 controls an IkkappaB kinase alpha (IKKalpha)-p53 signaling pathway in response to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha). *J Biol Chem*. 282:33943-33948.
- Yang, J., and M. Reth. 2010. Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature*. 467:465-469.
- Yang, Y., T. Ikezoe, T. Saito, M. Kobayashi, H.P. Koeffler, and H. Taguchi. 2004. Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer Sci*. 95:176-180.
- Yang, Y., J. Kitagaki, R.M. Dai, Y.C. Tsai, K.L. Lorick, R.L. Ludwig, S.A. Pierre, J.P. Jensen, I.V. Davydov, P. Oberoi, C.C. Li, J.H. Kenten, J.A. Beutler, K.H. Vousden, and A.M. Weissman. 2007. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res*. 67:9472-9481.

- Yao, T., L. Song, J. Jin, Y. Cai, H. Takahashi, S.K. Swanson, M.P. Washburn, L. Florens, R.C. Conaway, R.E. Cohen, and J.W. Conaway. 2008. Distinct modes of regulation of the Uch37 deubiquitinating enzyme in the proteasome and in the Ino80 chromatin-remodeling complex. *Mol Cell*. 31:909-917.
- Young, R.M., and L.M. Staudt. 2013. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov*. 12:229-243.
- Yu, L., F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E.H. Baehrecke, and M. Lenardo. 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:4952-4957.
- Yuan, J., K. Luo, L. Zhang, J.C. Cheville, and Z. Lou. 2010. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell*. 140:384-396.
- Yunis, J.J., M.G. Mayer, M.A. Arnesen, D.P. Aeppli, M.M. Oken, and G. Frizzera. 1989. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 320:1047-1054.
- Zaman, S., R. Wang, and V. Gandhi. 2014. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*.
- Zenz, T., J.G. Gribben, M. Hallek, H. Dohner, M.J. Keating, and S. Stilgenbauer. 2012. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*. 119:4101-4107.
- Zenz, T., A. Krober, K. Scherer, S. Habe, A. Buhler, A. Benner, T. Denzel, D. Winkler, J. Edelmann, C. Schwanen, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2008. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 112:3322-3329.
- Zenz, T., D. Mertens, R. Kuppers, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2010. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 10:37-50.
- Zenz, T., J. Mohr, E. Eldering, A.P. Kater, A. Buhler, D. Kienle, D. Winkler, J. Durig, M.H. van Oers, D. Mertens, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2009. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 113:3801-3808.
- Zhang, D., K. Zaugg, T.W. Mak, and S.J. Elledge. 2006. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*. 126:529-542.
- Zhang, L., A. Lubin, H. Chen, Z. Sun, and F. Gong. 2012. The deubiquitinating protein USP24 interacts with DDB2 and regulates DDB2 stability. *Cell Cycle*. 11:4378-4384.
- Zhang, N., Y. Qi, C. Wadham, L. Wang, A. Warren, W. Di, and P. Xia. 2010a. FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: a protective role of autophagy. *Autophagy*. 6:1157-1167.
- Zhang, N., K. Wilkinson, and M. Bownes. 1993. Cloning and analysis of expression of a ubiquitin carboxyl terminal hydrolase expressed during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 157:214-223.
- Zhang, S., and T.J. Kipps. 2014. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol*. 9:103-118.
- Zhang, W., A.P. Kater, G.F. Widhopf, 2nd, H.Y. Chuang, T. Enzler, D.F. James, M. Poustovoitov, P.H. Tseng, S. Janz, C. Hoh, H. Herschman, M. Karin, and T.J. Kipps. 2010b. B-cell activating factor and v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc) influence progression of chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:18956-18960.
- Zhang, X., F.G. Berger, J. Yang, and X. Lu. 2011a. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. *EMBO J*. 30:2177-2189.
- Zhang, Y., Y. Dai, T. Zheng, and S. Ma. 2011b. Risk Factors of Non-Hodgkin Lymphoma. *Expert opinion on medical diagnostics*. 5:539-550.
- Zhao, B., C. Schlesiger, M.G. Masucci, and K. Lindsten. 2009. The ubiquitin specific protease 4 (USP4) is a new player in the Wnt signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 13:1886-1895.

- Zhong, Q., W. Gao, F. Du, and X. Wang. 2005. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell*. 121:1085-1095.
- Zhu, H., L. Zhang, F. Dong, W. Guo, S. Wu, F. Teraishi, J.J. Davis, P.J. Chiao, and B. Fang. 2005. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*. 24:4993-4999.
- Zou, Q., J. Jin, H. Hu, H.S. Li, S. Romano, Y. Xiao, M. Nakaya, X. Zhou, X. Cheng, P. Yang, G. Lozano, C. Zhu, S.S. Watowich, S.E. Ullrich, and S.C. Sun. 2014. USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses. *Nat Immunol*. 15:562-570.

Annexes

Annexe I : Profils complets de DUB régulée par le BCR

RAMOS

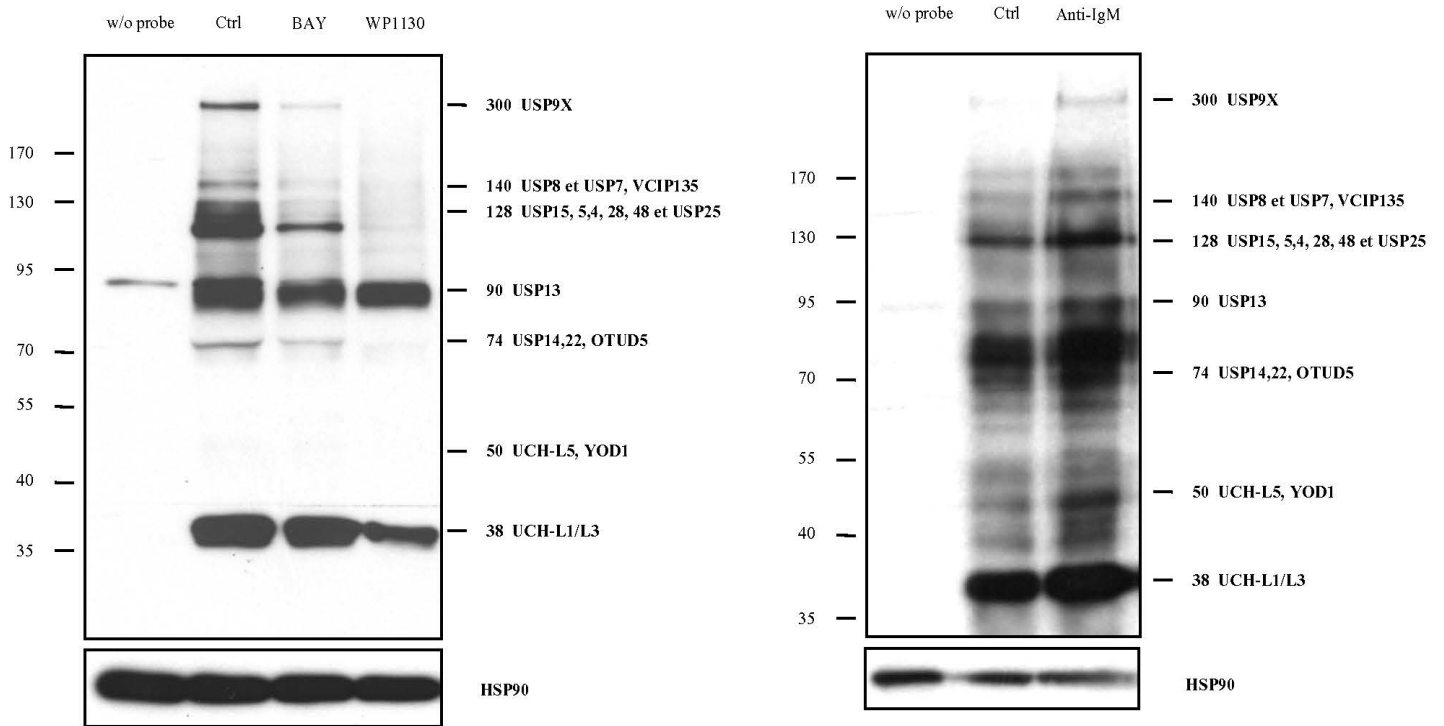


FIGURE 26 : Profils complets de DUB. Des cellules de Ramos sont traitées durant 6h avec du BAY et du WP1130 dans le panneau de gauche et 30 min avec un Anti-IgM dans le panneau de droite. Les lysats sont incubés 30 min avec une sonde HAUB-VS à 37°C puis blottés pour HA et HSP90 en contrôle de charge.

Liste des DUBs potentiellement régulées par le BCR

Protein	MW attendu (kDa)	Fonctions décrites
UCH-L1	≈38	Hydrolyse l'ubiquitine, les esters et amides en C-terminal. Exprimé dans les ovaires testicules et cerveau. Sur exprimé dans les lymphomes B, cancer du poumon et cancers colorectaux, il active les voies AKT et β -catenin/TCF. Dans les cancers de la prostate, gastrique, du rein, le mélanome, et divers carcinomes, il est méthylé et non exprimé.
UCH-L3	≈38	Hydrolyse l'ubiquitine, glycine et NEDD8 en C-terminal. Augmente indirectement la phosphorylation d'IGFIR, AKT et FOXO1 ainsi que la signalisation de l'insuline. Requisite dans les réponses au stress rétinale, aux muscles squelettiques et aux cellules germinales.
UCH-L5	≈50	Hydrolyse l'ubiquitine des chaînes K48. Se lie au 19S du protéasome. Régule la signalisation TGF- β /Smad et le facteur nucléaire κ B.
USP4	≈130	Recruté au spliceosome avec Start3, régule A2A récepteur et la voie Wnt. Régule ARF-BP1, TRAF2 et 6, PDK-1 et RIG-1. Interagit avec Rpn6 au protéasome. Est phosphorylé par AKT.
USP5	≈130	Régule indirectement p53. A un rôle dans le splicing des protéines et dans la réparation de la double hélice d'ADN.
USP7	≈140	Déubiquitine FOXO4, p53/TP53, MDM2, ERCC6, DNMT1, UHRF1, PTEN and DAXX. Joue ainsi un rôle dans la suppression de tumeur, la réparation de l'ADN, la réponse immunitaire et le contrôle épigénétique. Préférence pour la lysine 48.
USP8	≈140	Régule l'ubiquitination endosomale, le trafic intracellulaire, ainsi que le trafic membranaire vers les endosomes précoces. Déubiquitine STAM 2, RASGFR1, ESCRT-0, BIRC6/bruce, KIF23/MKLP1, EPS15 et la stabilité des tyrosines kinases.
USP9X	≈290	Surexprimée dans les lymphomes folliculaires, dans les lymphomes B et le myélome multiple. Joue un rôle dans la formation du système nerveux centrale. Déubiquitine Epsine, Mind Bomb1, Itch, β -catenin, Smad4 et MCL-1.
USP13	≈90	Orthologue d'USP5 (80%), régule PTEN, STAT1, Siah2 et joue un rôle dans la dégradation liée au réticulum endoplasmique.
USP14	≈70	Lié au protéasome participe à la régulation de son activité. Régule Dishevelled et la voie Wnt ainsi qu'l- κ B, CXCR4 et MCL-1. Joue un rôle dans les synapses et le développement du système nerveux.
USP15	≈130	Régule TGF- β récepteur (via TGFBR1) et la voie NF- κ B (via le complexe COP9). Déubiquitine la mono-ubiquitination des SMADs
USP16	≈130	Déubiquitine l'histone H2A et régule le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques.
USP22	≈70	Déubiquitine l'histone H2A et H2B. Facteur de mauvais pronostic dans les cancers de la gorge, du poumon et de la thyroïde. Gère la différenciation des cellules souches embryonnaires et régule INK4/ARF.
USP25	≈130	Lié à la dégradation liée au réticulum endoplasmique. Déubiquitine TRAF3, impact la signalisation de l'IL-17.
USP28	≈130	Déubiquitine c-MYC et LSD1.
USP48	≈130	Régule NHE3.
OTUD5	≈70	Déubiquitine p53.
VCIP135	≈140	Joue un rôle dans la fusion des membranes de Golgi.

Annexe II : Actin CytoFRET, a novel FRET flow cytometry method for detection of actin dynamics in resting and activated T cell

Technical Advance: Actin CytoFRET, a novel FRET flow cytometry method for detection of actin dynamics in resting and activated T cell

Frédéric Larbret,^{*,†} Nicholas Dubois,^{‡,§} Frédéric Brau,^{||} Elodie Guillemot,^{§,¶} Karim Mahiddine,[†] Sophie Tartare-Deckert,^{‡,§} Valérie Verhasselt,^{*} and Marcel Deckert^{‡,§,1}

^{*}Tolérance Immunitaire and [§]Faculté de Médecine, Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France; [†]INSERM, U576, Flow Cytometry Facility, Hôpital Archet 1, Nice, France; [‡]INSERM, U1065, C3M, Microenvironnement, Signalisation et Cancer, Nice, France; ^{||}CNRS, UMR6097, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France; and [¶]FRE-CNRS 3472, Nice, France

RECEIVED JANUARY 11, 2013; REVISED MAY 30, 2013; ACCEPTED JUNE 1, 2013. DOI: 10.1189/jlb.0113022

ABSTRACT

Actin cytoskeleton plays a critical role in regulating T cell motility and activation. However, the lack of a real-time quantitative method to analyze actin assembly has limited the progress toward understanding actin regulation. Here, we describe a novel approach to probe actin dynamics on living T cells using FRET combined with flow cytometry. We have first generated a Jurkat T cell line stably coexpressing EGFP and mOrange FPs fused to actin. The real-time variation of actin monomer assembly or disassembly into filaments was quantified using a ratiometric flow cytometry method measuring changes in the mOrange/EGFP emission ratio. The method was validated on resting T cells by using chemical compounds with known effects on actin filaments and comparison with conventional microscopy imaging. Our method also detected the rapid and transient actin assembly in T cells stimulated by anti-CD3/CD28-coated beads, demonstrating its robustness and high sensitivity. Finally, we provide evidence that lentiviral-mediated transduction of shRNAs in engineered Jurkat cells could be used as a strategy to identify regulators of actin remodeling. In conclusion, the flow cytometric FRET analysis of actin polymerization represents a new technical advance to study the dynamics of actin regulation in intact cells. *J. Leukoc. Biol.* 94: 000–000; 2013.

Abbreviations: EC₅₀=half-maximal effective concentration, EYFP=enhanced YFP, FP=fluorescent protein, FRET=fluorescence resonance energy transfer, FRET-ACT=FRET-actin reporter cell line, FRET-CTRL=FRET-control reporter cell line, HSP90=heat shock protein 90, IS=immunological synapse, JASP=Jasplakinolide, LB=Latrunculin B, MFI=mean fluorescence intensity, mTFP1=monomeric teal (cyan) fluorescent protein derived from *Clavularia* cFP484, PGK=phosphoglycerate kinase, RNAi=RNA interference, sh=small hairpin, WASP=Wiskott-Aldrich syndrome protein, WPRE=woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

Introduction

Actin cytoskeleton dynamics critically regulate a variety of biological processes, including T cell activation [1]. One central event of T cell stimulation is the formation of cell–cell contacts between lymphocytes and APCs, leading to the formation of an actin-rich structure at the T cell/APC contact zone, known as the IS [2, 3]. This event involves the engagement of the TCR and membrane receptors, such as the costimulatory receptor CD28, that triggers multiple intracellular signaling pathways [4, 5]. In addition to integrating these complex molecular pathways of T cell activation, actin reorganization controls additional intrinsic properties of circulating T lymphocytes, including cell plasticity, polarization, adhesion, migration, and survival [6].

In spite of the importance of actin remodeling for proper T cell functions, there is a paucity of methods allowing the real-time monitoring of actin dynamics in living lymphocytes. Phalloidin staining is a popular method to measure the total amount of F-actin. However, cells need to be fixed and permeabilized, prohibiting live cell analysis and real-time monitoring of actin dynamics. In addition, phalloidin has been reported to share its binding site with the actin-binding protein cofilin, thus altering the pattern of actin filaments labeled by phalloidin [7]. FRET analysis has emerged as a convenient approach to investigate the dynamics of protein–protein interactions in living systems. Previous studies have reported the use of fluorescent-actin variants combined with the FRET technique to analyze the equilibrium between G-actin and F-actin in other cellular systems [8, 9] and highly plastic cellular structures, such as the neuronal synapse [10]. However, a major drawback of these methods is that they are based on nonquantitative time-lapse microscopy examination, which is time-consuming

1. Correspondence: University of Nice Sophia-Antipolis, INSERM U1065 (C3M), Team "Microenvironnement, Signaling and Cancer," Bâtiment Universitaire Archimède, 151 Route de Ginestière BP 23194, 06204 Nice cedex 3, France. E-mail: deckert@unice.fr

and lacks robust statistical analysis. In addition, the interpretation of the results may present a high degree of subjectivity [11]. Furthermore, investigations on nonadherent living cells raise additional difficulties for time-lapse microscopy measurements because of random cell movements that make cell tracking technically challenging. Compared with conventional microscopy, flow cytometry analysis of living cells displays several advantages, including being population-based and permitting the fast recording of a large number of events. The majority of FRET determinations carried out with flow cytometry was developed for cytometers equipped with 488 nm and 405 nm lasers adapted to the popular pair of FPs—CFP and YFP [12–15]. However, the photophysical properties of this fluorescent tandem are not optimal for FRET experiments. First, CFP and YFP have broad excitation and emission spectra with a small Stokes shift [16]. Second, quantum yield of CFP is low, implying that a relatively high amount of excitation energy is needed to generate FRET. Moreover, YFP can photoconvert into CFP-like species [17]. Finally, other FPs have emerged during the last several years [18], increasing the possibility to develop FRET pairs of fluorescent markers best adapted for quantitative flow cytometry analysis.

In this study, we report the development of a novel method of actin dynamics monitoring in live T cells based on FRET detection by flow cytometry. Following the optimization of different FRET reporters formed by two FPs (donor and acceptor), we generated a Jurkat T cell line stably expressing EGFP- and mOrange-actin fusion proteins to assess the equilibrium between G- and F-actin in living cells. Our method was validated on resting and stimulated T cells by using chemical actin cytoskeleton modulators and lentiviral-mediated transduction of shRNAs targeting the regulator of actin polymerization, WASP. The flow cytometric FRET analysis of actin assembly thus represents a new technical advance to study the dynamics of actin regulation in intact T cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells, culture, antibodies, and reagents

The Jurkat T cell leukemic line and 293T human kidney cells were from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Jurkat and 293T cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in RPMI, supplemented with 10% FBS (HyClone, South Logan, UT, USA) and DMEM, 10% FBS, respectively. Antibodies against β -actin, EGFP, WASP, and HSP90 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-mOrange was from Clontech (Mountain View, CA, USA). Chemicals and actin toxins were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). For treatment with actin toxins, Jurkat cells were grown in 48-well plates at a density of 1×10^5 cells/ml and incubated with JASP and LB at 500 nM for different times at 37°C.

Plasmid constructions

Plasmid constructions, cloning, and DNA sequencing were carried out according to standard protocols. The plasmids encoding EYFP, mCherry, and mOrange were from Clontech. The plasmid encoding CFP H148D [19] was a kind gift from Dr. Oliver Albagli (INSERM U790, Institut Gustave Roussy, PR1, 39 Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France). For single-color expression (EGFP, mOrange, CFP H148D, T-Sapphire, or mTFP1), the pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP.WPRE vector (Plasmid #12252; Addgene, Cambridge, MA, USA) was transformed by replacing EGFP cDNA with a cDNA

encoding a different FP using *Bam*HI and *Bsr*GI digestion. The fusion FP pairs CFP/EYFP, EGFP/mCherry, and EGFP/mOrange were also cloned by adding at the C-terminal of the donor FP the appropriate acceptor FP into the *Bsr*GI site of the pRRL vectors transformed previously. For the fusion FP pairs T-Sapphire/mOrange and mTFP1/mOrange, we modified the pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP-mOrange.WPRE vector by replacing EGFP with T-Sapphire (provided by Dr. Otilia Zapata-Hommer, Max-Planck-Institut für Neurobiologie Am Klopferspitz 18a 82152 Martinsried, Germany) or with the mTFP1 (a gift from Dr. Oliver Albagli) using the *Bam*HI and *Bsr*GI cutting sites. For EGFP fused to actin or mOrange fused to actin, actin cDNA was amplified by PCR using the following primers: 5'-GCCCGATAACCACTACTGT-3' and 5'-ATAATAGTACTACTAGAAGCATTTCGCG-3'. The amplified cDNA was then cut with *Bsr*GI inserted into the *Bsr*GI sites of pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP.WPRE or pRRLSIN.cPPT.PGK-mOrange.WPRE. The sh-LacZ control pENTR/H1/TO vector was described previously [20]. The H1-shLacZ cassette from the pENTR/H1/TO plasmid was cut using *Sa*II and *Eco*RV and inserted into the *Xho*I and *Eco*RV sites of the pRRLSIN.cPPT.PGK-CFP.WPRE lentiviral vector. The WASP shRNA lentiviral expression vector pRRL-H1-shWASP-PGK-EGFP was a generous gift of Dr. Anne Galy (INSERM, UMR_S951, Généthon, Evry, France) [21]. The cDNA encoding EGFP in the original vector was replaced by CFP H148D cDNA using *Bam*HI and *Bsr*GI restriction sites.

Lentivirus production

Lentiviral particles were produced as described previously [22]. Briefly, 293T cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with pMD2.G (Plasmid #12259; Addgene) and pCMV8.74 (Plasmid #22036; Addgene) and a selected pRRL vector from those described above. Supernatants were collected 72 h after the transfection, centrifugated for 5 min at 3000 rpm, and filtered. Lentivirus stocks containing $\sim 10^9$ infectious particles/ml were aliquoted and stored frozen at -80°C .

Generation of FRET reporter and stable shRNA cell lines

To generate the FRET reporter cell lines, 1×10^5 Jurkat cells were infected with 1 ml lentiviral particles encoding EGFP-actin for 12 h, washed, and cultured for 48 h. Cells were then washed twice and cloned by FACS with a BD FACSAria II cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After 3 weeks, the EGFP-actin-expressing Jurkat cells were infected with mOrange-actin or free mOrange lentiviral particles. Cells expressing a similar and high amount of mOrange were then cloned by cell sorting to generate the FRET-ACT and the FRET-CTRL. Stable shRNA Jurkat cells were obtained following infection with lentiviral particles encoding shRNA sequences targeting LacZ and WASP mRNAs. Cells were washed, cultured for 48 h, and sorted on a BD FACSAria II cell sorter.

Cell lysis and immunoblotting

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer: 1% Triton X-100 in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) for 30 min on ice. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analyses as described before [20].

Measurement of F-actin/G-actin ratio

Cells were washed in ice-cold PBS prior to lysis with 500 μ l F-actin stabilization buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 30% glycerol, 5% DMSO, 1 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM ATP, and protease inhibitors) on ice for 10 min. Supernatants containing G-actin were recovered after centrifugation at 16,000 *g* for 75 min at 4°C. Pellets containing F-actin were resuspended in 500 μ l F-actin depolymerization buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂, and 5 μ M cytochalasin D) on ice for 1 h. Equal volumes of supernatant (G-actin) and pellet (F-actin) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against actin,

EGFP, or mOrange. The ratios of F-actin to G-actin were determined for endogenous actin, EGFP-actin, and mOrange-actin using densitometry and ImageJ software.

CD3/CD28-mediated Jurkat activation

FRET-CTRL and FRET-ACT Jurkat cells were activated with anti-CD3/CD28-coupled beads (Dynabeads human T-activator CD3/CD28; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells (1×10^4) were cultured with beads (1×10^5) in 200 μ l RPMI 1640 with 10% FBS in a round-bottom microplate for different times at 4°C or 37°C. The beads were then labeled with Alexa Fluor 647-conjugated anti-IgG1 antibody during 15 min at 4°C or 37°C. Cell/bead conjugates were analyzed by flow cytometry by gating on Alexa Fluor 647 fluorescence. FRET ratio was then determined on FRET-CTRL and FRET-ACT cells in conjugates formed at 4°C or 37°C. The efficacy of cell/bead conjugation was also verified by confocal microscopy.

Phalloidin staining

Jurkat cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS and permeabilized with 0.05% saponin in PBS, 1% BSA, for 20 min at room temperature. Cells were washed, and F-actin was labeled with 100 ng/ml Alexa Fluor 647 phalloidin (Life Technologies) for 30 min at 22°C. Following three washes in 1% BSA in ice-cold PBS, polymerized actin was measured by flow cytometry or confocal microscopy.

FRET measurement

To measure FRET for EGFP-mCherry and EGFP-mOrange tandems, cells were excited with the 488-nm laser, and donor fluorescence was collected in the EGFP channel with a 530/30-nm filter, whereas the FRET-signal was measured with a 585/42-nm filter for mOrange and 610/15-nm filter for mCherry. To measure mOrange, cells were excited at 560 nm, whereas emission was taken with a 585/42-nm filter. For experiments with CFP H148D-EYFP and T-Sapphire-mOrange FP pairs, a 405-nm excitation wavelength was used. CFP H148D and T-Sapphire fluorescence emissions were detected through 460/20- and 510/50-nm bandpass filters, respectively, whereas FRET signals were measured with a 530/30-nm filter for the CFP H148D-EYFP couple and a 585/82-nm for the T-Sapphire/mOrange pair. These measurements were performed using a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) equipped with four lasers (405, 488, 633, and 560 nm). The mTFP1-mOrange FRET pair was analyzed using a FACSVantage SE flow cytometer equipped with a 457-nm wavelength excitation laser. mTFP1 fluorescence emission was then collected with a 510/50-nm bandpass filter and FRET signal with a 582/42-nm filter.

FRET measurements on treated or untreated FRET-CTRL and FRET-ACT cells were performed using Fortessa or FACSCanto II flow cytometers by using a 488-nm donor-excitation wavelength. FRET variations were calculated by determining the ratio between the fluorescence intensity emitted at 585/42 nm that corresponds to mOrange emission as a result of FRET and the fluorescence intensity emitted at 530/30 nm corresponding to EGFP. For each sample, we evaluated a minimum of 5000 cells that fell within the adjusted morphology gate.

Confocal microscopy analysis

Confocal laser-scanning microscopy analyses were performed on living FRET-ACT cells cultivated in chamber slides (Lab-Tek, Hatfield, PA, USA). Observations were performed with a laser-scanning confocal microscope (LSM780; Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA), equipped with an AxioObserver inverted microscope, using a Plan-Apochromat 63 \times /1.4 NA oil-immersion objective. The EGFP, mOrange, and FRET emissions were imaged by a λ acquisition (32 images) on a spectral window with the multichannel detector from 500 to 670 nm, with a 488-nm argon laser excitation. Mean intensity of FRET (image at 590 nm) versus EGFP emission (image at 510 nm) was extracted from the λ series on regions of interest drawn on the cells. Data were represented as a FRET ratio determination. In some experiments, FRET-ACT cells were cultured on fibronectin-coated chamber slides

before phalloidin staining, as described above, and microscopy analysis of F-actin, EGFP-actin, and mOrange-actin distribution.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, experiments were repeated at least three times, and representative data are shown. Data are expressed as the mean \pm SD. Student's *t*-tests were performed to determine statistical significance. A *P* value of <0.05 was considered significant.

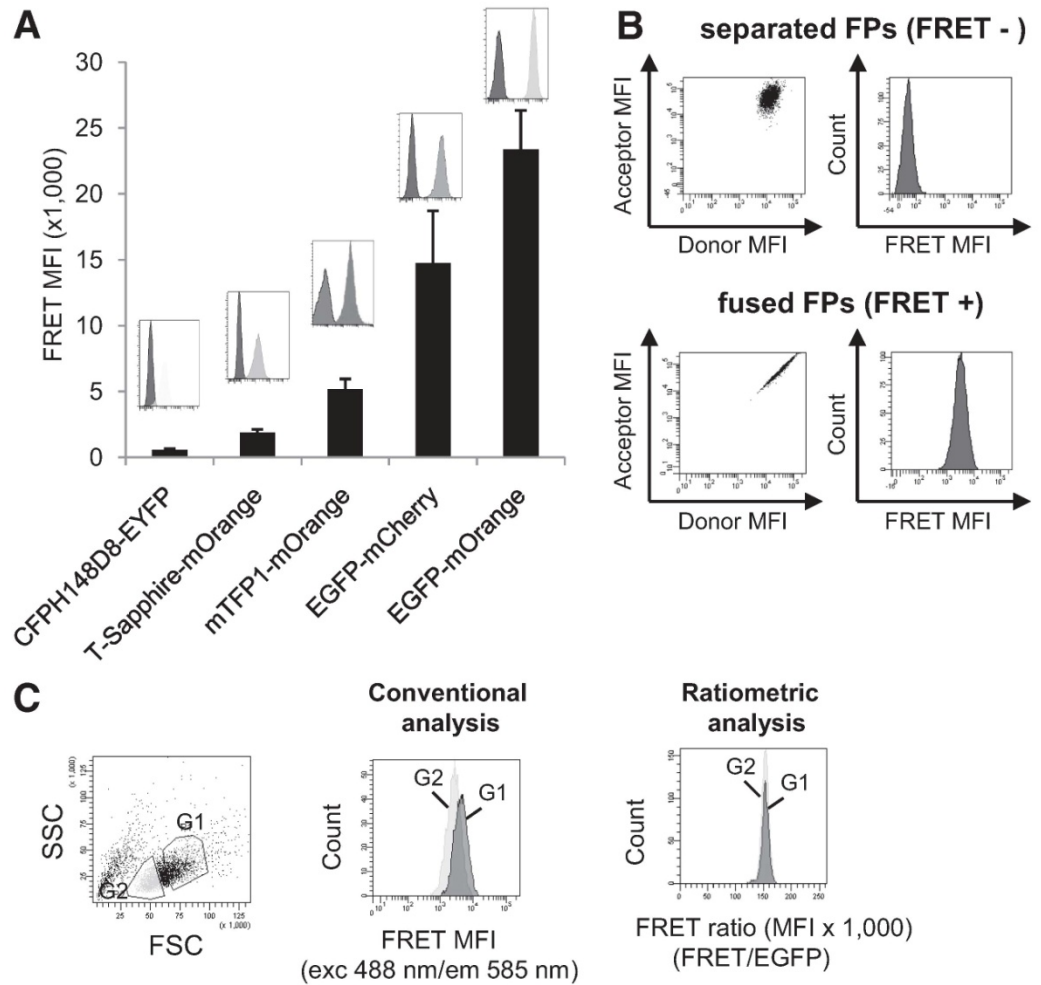
RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of FRET analysis by flow cytometry

To establish an assay to measure FRET signals by FACS, we first determined the most efficient pair of FPs in the flow cytometry analysis. The combination of ECFP and EYFP is one of the most popular currently used in FRET analysis. However, this pair of FP is not optimal because of the low quantum yield of ECFP and the spectral overlap between donor and acceptor (66%; Supplemental Table 1). We thus constructed and tested five different pairs of FP for flow cytometric energy-transfer measurements, according to the spectral overlap between donor and acceptor FP, their quantum yield, their stability, and the percentage of donor absorbance laser (Supplemental Table 1). Fluorescent properties also had to be adapted for lasers found in commonly available flow cytometers. With the use of three donor proteins with the excitation wavelengths CFP H148D and T-Sapphire (405 nm), mTFP1 (457 nm), and EGFP (488 nm) and two acceptor proteins with the excitation wavelengths EYFP (488 nm) and mCherry and mOrange (560 nm), we designed five chimeras with the same polypeptide linker between donor and acceptor (Supplemental Fig. 1A). With the use of lentiviral gene transduction, each pair of FP was stably expressed in Jurkat cells. FRET analysis by FACS was then performed using a standard method, based on the measurement of the acceptor fluorescence under the donor-excitation source (Supplemental Fig. 1B). For each FP used, we applied a set of filters detailed in Supplemental Fig. 1A. We then determined the most efficient FRET pair by comparing the MFI on the donor-excitation laser line and found that the EGFP-mOrange fusion was the best pair of FPs in the production of FRET signals (Fig. 1A). As a control, we show that when expressed separately in Jurkat cells, donor and acceptor did not produce FRET signals compared with the FP fusion (Fig. 1B) and that each FP fusion was expressed at a similar protein level, as indicated by immunoblot analysis (Supplemental Fig. 1C). In addition to an optimally excited donor protein, mOrange shows a higher quantum yield and spectral overlap with EGFP than mCherry, thus explaining the performance of the EGFP-mOrange fusion in terms of FRET emission (Fig. 1A).

We next compared FRET signals obtained with the EGFP-mOrange pair by flow cytometry using two different methods: the conventional FRET analysis consisting of the measure of acceptor intensity under the donor-excitation wavelength and a ratiometric analysis, in which the ratio of acceptor and donor signals is determined under the donor-excitation wavelength (FRET ratio; Fig. 1C). Unlike the conventional method, the ratiometric method takes into account the modification of the fluorescence properties of both donor and acceptor FPs, such as donor-quenching or acceptor fluorescence emission.

Figure 1. Optimization of flow cytometric FRET analysis. (A) Representative FACS histograms showing the intensity of the FRET signal in cells transduced with the indicated pair of fused, donor-acceptor FPs compared with the mock signal. Bar histograms show relative MFI of FRET for each kind of fused FPs. Data represent the mean \pm SD of three different experiments. (B) Jurkat cells were transduced with separated donor (EGFP) and acceptor (mOrange) FPs or with fused donor-acceptor FPs, and the FRET signal was analyzed by flow cytometry. A representative determination out of three independent experiments is shown. (C) Comparison of two different flow cytometry methods to measure FRET of the EGFP-mOrange FP pair. Two morphological gates (G1 and G2) were drawn to analyze Jurkat cells expressing the EGFP-mOrange FP pair (left). FRET signals were then measured in G1 and G2 by the conventional method consisting of the measure of acceptor intensity under the donor excitation wavelength [excitation (exc) 488 nm/emission (em) 585 nm; middle] or a ratiometric analysis, in which a ratio between FRET signals (excitation 488 nm/emission 585 nm) and EGFP signals (excitation 488 nm/emission 510 nm) is determined (right). Data are representative of three determinations. SSC, Side-scatter; FSC, forward-scatter.



In addition, the ratiometric method is likely to decrease non-FRET fluorescence variations that follow changes in culture conditions (e.g., pH changes, reagent addition) or autofluorescence induced by cell-size modifications. Indeed, cell-size increase (Gate G1 vs. G2) resulted in increased, nonspecific FRET signals when measured with the conventional method (22,229 vs. 15,352) but not with the ratiometric method (152,309 vs. 152,242), which takes into account the modification of both donor and acceptor FPs (Fig. 1C). Another advantage of the ratiometric analysis is the use of a linear fluorescence scale that allows the representation of FRET variations as a percentage of variation from basal FRET. The EGFP and mOrange pair of FPs, combined with a ratiometric method of FRET analysis by flow cytometry, was hence chosen for subsequent analyses.

Generation of a reporter cell line for the analysis of FRET-actin sensors by flow cytometry

First, EGFP and mOrange fluorescent chimeras of actin proteins were engineered. As the distance between actin monomers in F-actin is 55 Å, the alignment of donor and acceptor fluorescent-actin variants in filaments allows the generation of

FRET signals resulting from actin dynamics in living cells, as shown in the schematic view of our method's principle (Fig. 2A). With the use of a combination of sequential lentiviral transduction and single-cell sorting (Supplemental Fig. 2), we generated two Jurkat cell lines: a FRET-negative control cell line stably expressing EGFP-actin and free mOrange (FRET-CTRL cell line) and a FRET-positive experimental cell line stably expressing EGFP-actin and mOrange-actin (FRET-ACT cell line). One limitation of our method may arise from the inclusion of endogenous actin monomers into actin filaments, a phenomenon that may decrease the alignment of FRET-generating donor and acceptor fluorescent-actin monomers. However, densitometry analysis of an antiactin immunoblot showed that actin FPs represented 51% of the total amount of actin in FRET-ACT cells, reducing the impact of this aspect on FRET dynamics. Also, the relative expression of actin FPs was found similar, as shown by immunoblot analysis using anti-EGFP and anti-mOrange antibodies (Fig. 2B). We next controlled that the actin FPs are properly incorporated into actin cytoskeleton of Jurkat cells. A biochemical sedimentation method separating F-actin from G-actin showed that EGFP-actin, mOrange-actin, and endogenous actin were distributed equally into F-actin

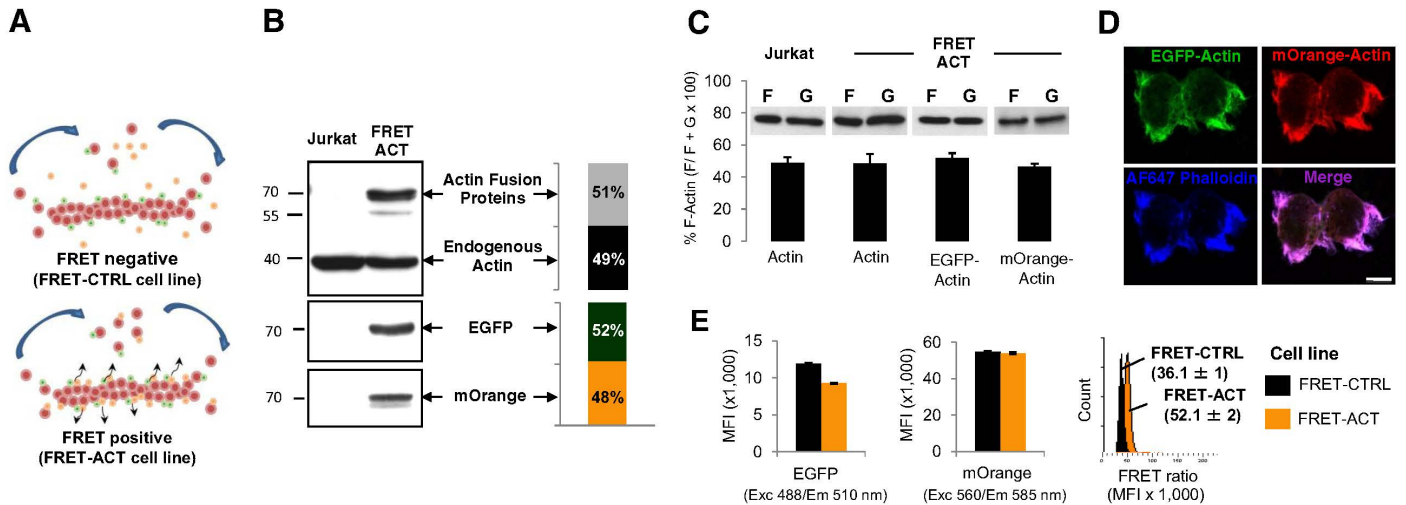


Figure 2. Development of FRET-CTRL and FRET-ACT Jurkat cells. (A) Principle of the method. FRET-ACT cells express EGFP-actin and mOrange-actin FPs. FRET-CTRL cells express the EGFP-actin FP and free mOrange. In FRET-ACT cells, but not in FRET-CTRL, when EGFP-actin and mOrange-actin locate close to each other in polymerized actin, FRET signals are emitted. (B) The amount of actin fusion proteins in FRET-ACT cells was compared with endogenous actin levels by immunoblotting with antibodies against actin, EGFP, and mOrange. Histograms show the relative expression of each form of actin as determined by densitometry. Data are representative of three experiments. (C) Analysis of the distribution of endogenous actin, EGFP-actin, and mOrange-actin in filamentous (F) versus globular (G) actin pools. Fractions containing F- and G-actin were isolated from Jurkat or FRET-ACT cells, as described in Materials and Methods and analyzed by anti-actin immunoblotting. Histograms represent the ratio of F/G-actin in each condition. Data, representative of two experiments, were determined by band densitometry using ImageJ software. (D) Colocalization of EGFP-actin, mOrange-actin, and endogenous F-actin in FRET-ACT cells. Cells were grown on fibronectin-coated chamber slides for 24 h at 37°C before staining with Alexa Fluor 647 phalloidin and confocal microscopy analysis of EGFP-actin, mOrange-actin, and endogenous F-actin distribution. Micrographs are representative of two experiments. Original scale bar = 5 μ m. (E) Ratiometric analysis of FRET signals generated by FRET-CTRL and FRET-ACT cell lines. Cells were analyzed by flow cytometry using the ratiometric method described above. Left histograms represent the MFI of mOrange and EGFP signals in FRET-ACT and FRET-CTRL cells. (Right) Representative FACS histogram of FRET signals in FRET-ACT and FRET-CTRL cells and the mean \pm SD of five different determinations.

(Fig. 2C). Confocal microscopy next confirmed that EGFP-actin and mOrange-actin fluorescence signals overlapped phalloidin staining in adherent FRET-ACT cells (Fig. 2D). FRET signals were then analyzed by flow cytometry using the ratiometric method described above. As shown in Fig. 2E, FRET-ACT cells emitted stronger FRET signals than FRET-CTRL cells (44% increase in FRET-ACT cells compared with FRET-CTRL cells). As controls, levels of mOrange-actin and free mOrange expression were found identical in each cell line, as shown by FACS measurement under 560 nm excitation. The slight decrease of EGFP donor fluorescence observed in FRET-ACT cells is likely a result of donor quenching induced by the low basal FRET signal emitted by FRET-ACT cells, a process that is expected in living cells with spontaneous actin cytoskeleton plasticity.

Pharmacological validation of FRET-actin analysis by flow cytometry

To examine whether our method accurately reflects actin dynamics in living cells, we tested the effect of the actin-depolymerizing drug LB and the stabilizing agent JASP. FRET-CTRL and FRET-ACT cells were treated for different times at 37°C, and FRET ratio variations were monitored in real time by FACS. As shown in Fig. 3A, JASP rapidly increased FRET signals, whereas LB resulted in a decrease of FRET signals. Sta-

tistical analysis of these effects after 30 min of treatment showed that JASP and LB induced a $30 \pm 2\%$ increase and $8 \pm 3\%$ decrease of the FRET ratio, respectively (Fig. 3B). In contrast, no significant effect of these compounds was observed when applied to FRET-CTRL cells. The effect of JASP on FRET signal was in agreement with previous studies showing that JASP stabilizes actin filaments and enhances the rate of actin-filament nucleation [23, 24]. Conversely, the effect of LB can be attributed to its capacity to complex with actin monomers, thereby inhibiting actin polymerization [25]. The separated determination of FRET signal variations and EGFP intensities are shown in Supplemental Fig. 3. Flow cytometric analysis of cells stained with Alexa Fluor 647 phalloidin indicated that the reduction in FRET signals that followed LB treatment correlated with a decrease in phalloidin staining (Supplemental Fig. 4). Further analyses showed that the variation of FRET-actin signals induced by JASP and LB on FRET-ACT cells changed as a function of the drug concentration (Fig. 3C). The EC_{50} for JASP and LB, calculated using the FRET-actin method (50 nM and 139 nM, respectively), was consistent with published EC_{50} for these two drugs [23, 25], demonstrating the sensitivity of our method. However, LB seems to have a relatively smaller effect on FRET signals compared with phalloidin staining. At the molecular level, it is possible that upon LB, a basal level of FRET signals persists as a result of discrete

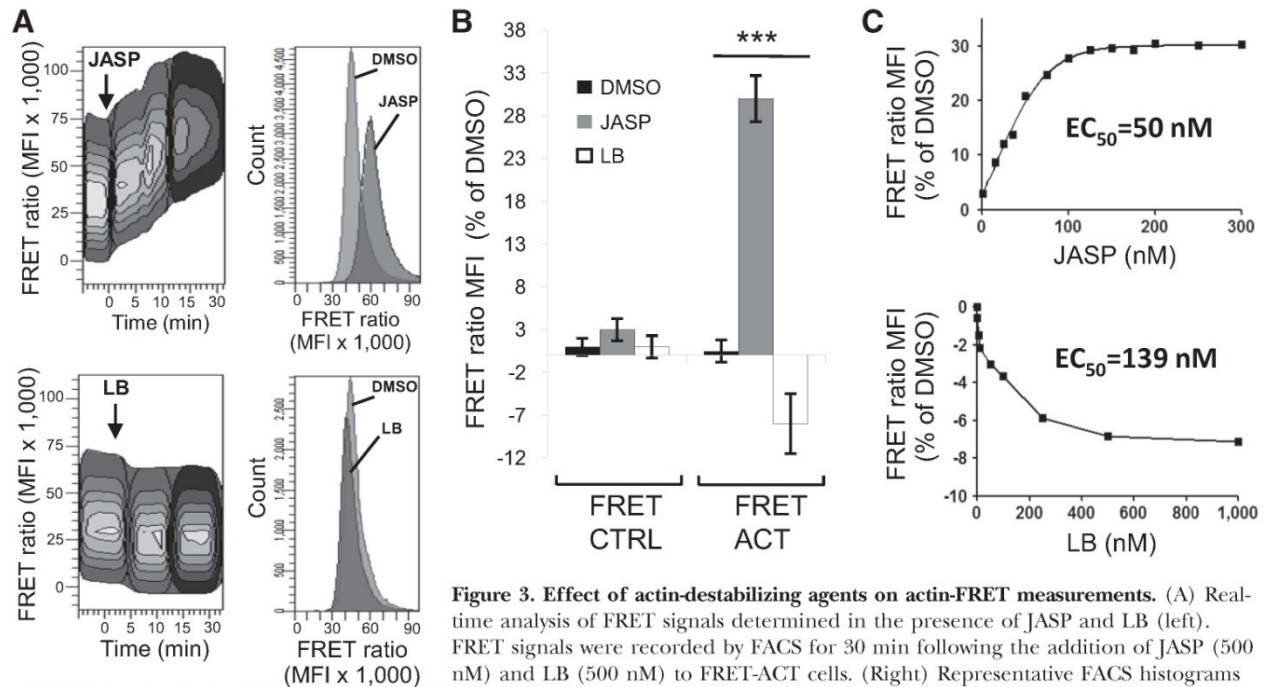


Figure 3. Effect of actin-destabilizing agents on actin-FRET measurements. (A) Real-time analysis of FRET signals determined in the presence of JASP and LB (left). FRET signals were recorded by FACS for 30 min following the addition of JASP (500 nM) and LB (500 nM) to FRET-ACT cells. (Right) Representative FACS histograms of FRET signals obtained following 30 min of treatment with JASP, LB, and DMSO as a control vehicle. (B) Statistical analysis of the variations of the FRET ratio induced by JASP and LB treatment. FRET-CTRL and FRET-ACT cells were untreated or treated with DMSO, JASP (500 nM), and LB (500 nM) for 30 min at 37°C, and FRET signals were recorded by FACS. Data are expressed as the percentage of the actin-FRET ratio MFI between untreated (DMSO) and treated cells. The mean ± SD of six determinations is shown (***) $P < 0.001$. (C) Dose determination of JASP and LB treatment on actin-FRET signals. Cells were incubated with different concentrations of each drug for 30 min at 37°C. FRET signals were then collected and expressed as described above. The EC₅₀ for each drug was calculated using GraphPad software. Data are representative of two independent experiments.

of FRET signals obtained following 30 min of treatment with JASP, LB, and DMSO as a control vehicle. (B) Statistical analysis of the variations of the FRET ratio induced by JASP and LB treatment. FRET-CTRL and FRET-ACT cells were untreated or treated with DMSO, JASP (500 nM), and LB (500 nM) for 30 min at 37°C, and FRET signals were recorded by FACS. Data are expressed as the percentage of the actin-FRET ratio MFI between untreated (DMSO) and treated cells. The mean ± SD of six determinations is shown (***) $P < 0.001$. (C) Dose determination of JASP and LB treatment on actin-FRET signals. Cells were incubated with different concentrations of each drug for 30 min at 37°C. FRET signals were then collected and expressed as described above. The EC₅₀ for each drug was calculated using GraphPad software. Data are representative of two independent experiments.

actin nucleation sites refractory to phalloidin labeling, in which actin monomers complexed with sequestering proteins could induce FRET signals [26, 27]. These observations therefore establish a minimum threshold of actin dynamic detection by FRET in live cells.

To validate further our FACS-based FRET assay, we performed a confocal laser-scanning microscopy analysis on living FRET-ACT cells cultured in chamber slides. To compare with flow cytometric FRET determinations, data were represented as a FRET ratio calculated for 30 cells (Fig. 4A). JASP treatment led to the appearance of large masses of polymerized actin at the cortical region of FRET-ACT cells (Fig. 4B, upper), associated with a dramatic increase of FRET-actin signals (Fig. 4B, lower). On the contrary, exposure to LB, which resulted in the diminution of cortical actin that was replaced by a more diffuse fluorescence, induced the reduction of FRET signals (Fig. 4B, lower). Confocal microscopy and flow cytometric analyses of FRET-actin variations induced by JASP and LB treatment generated similar results. The increase of the FRET ratio induced by JASP was determined to be 27% by microscopy and 28% by flow cytometry, whereas the decrease of the FRET ratio, resulting from LB treatment, was determined to be 11% by microscopy and 7% by flow cytometry (Fig. 4C). Thus, our technique of FRET analysis by flow cytometry appears as sensitive as microscopy.

Flow cytometric FRET analysis of actin dynamics induced by CD3/CD28 stimulation

A dynamic reorganization of the actin cytoskeleton in response to TCR and the engagement of costimulatory receptors are required for IS formation and subsequent optimal T cell activation [2, 3]. To examine the effect of T cell activation on FRET-actin signals, FRET-CTRL and FRET-ACT cells were incubated with anti-CD3/CD28-coated polymer beads at 4°C or 37°C. After 45 min of incubation, beads were labeled with anti-IgG1, coupled with Alexa Fluor 647, and the mixture of cells and beads was analyzed by confocal microscopy and flow cytometry. Unlike cells incubated at 4°C, cells incubated at 37°C with anti-CD3/CD28 beads showed a clear enrichment of EGFP-actin at the Jurkat T cell-bead contact zone that is typical of an activated and polarized T cell (Fig. 5A, white arrows). A flow cytometric recording of FRET signals was performed on the populations P1 and P2, corresponding to the cell population free of beads and to the cell population attached to beads, respectively (Fig. 5B, left). We found that temperature had no significant effect on FRET signals emitted by the P1 population from FRET-CTRL or FRET-ACT cells. When the P2 population was examined, we observed a strong increase of FRET signals at 37°C on FRET-ACT cells but not on FRET-CTRL cells (Fig. 5B, right). The increase of FRET signals at 37°C in bead-conjugated FRET-ACT cells (P2) was time-dependent (Fig. 5C). Finally, the variation of FRET signals between

Effect of WASP knockdown on actin dynamics measured by flow cytometric FRET

We next examined whether our method can be adapted to the detection of actin-remodeling events induced by RNAi-mediated suppression of actin cytoskeleton regulators. WASP is involved in actin-filament formation through its interaction with the cytoskeletal-organizing complex actin-related protein 2/3 [28]. WASP deficiency has been linked to immune and hematopoietic cell dysfunction, resulting from cytoskeletal abnormalities [29]. WASP has also been implicated in T cell development, activation, and migration [6, 30, 31]. Here, we used lentiviral-mediated delivery of shRNA to stably knock down WASP expression in FRET-ACT Jurkat cells (Fig. 6A). Control phalloidin stainings performed on shLacZ and shWASP FRET-ACT cells showed that WASP knockdown decreased actin polymerization induced by TCR stimulation (Fig. 6B). With the use of the same approach described above to activate FRET-ACT cells, we analyzed actin-FRET signals on resting (P1) and activated (P2) populations of cells, transduced (CFP+) or not (CFP-) by the lentiviral shRNA constructs (Fig. 6C, upper). Flow cytometry analysis indicated that WASP knockdown had no significant effect on FRET signals emitted by resting cells (Fig. 6C, lower). When shLacZ FRET-ACT cells (CFP+ population) were activated with anti-CD3/CD28 beads for 1 h at 37°C, we found that conjugated Jurkat T cells (P2) displayed a clear increase in actin-FRET signals compared with unconjugated cells (P1). In contrast, increased FRET signals induced by anti-CD3/CD28 beads were reduced in WASP-deficient FRET-ACT cells (CFP+ P2 population). Statistical analysis showed that the FRET ratio MFI in activated shLacZ and shWasp cells was $182.6 \pm 2\%$ and $141.3 \pm 2\%$, respectively (Fig. 6D). Our data thus indicate that de novo formation of actin filaments induced by T cell activation generated FRET signals that required WASP expression. The partial effect of WASP knockdown on activation-dependent variation of FRET ratio was consistent with the existence of other T cell-actin regulators [3, 6].

In conclusion, we describe here a novel method of flow cytometric detection of FRET signals designed as a sensor of live remodeling of actin cytoskeleton in T cells. This technique, which appears complementary to conventional approaches, such as fluorescence microscopy, is adapted to pharmacological and genetic screenings of regulators of spontaneous and activation-induced actin polymerization. The possibility to “automatize” the entire process makes it attractive for high-throughput screening strategies aimed at identifying small molecule inhibitors of actin cytoskeleton. This aspect is important to develop new therapeutic agents targeting actin cytoskeleton in a wide range of pathologies, including immunological and allergic diseases and cancer. Furthermore, the association of our method with the RNAi approach represents an alternative tool to identify and study new proteins regulating actin dynamics. Finally, the development of novel FPs [32] will certainly increase the future applications of this technique. More generally, our method may prove useful for the study of other protein-protein interactions involved in critical cellular processes.

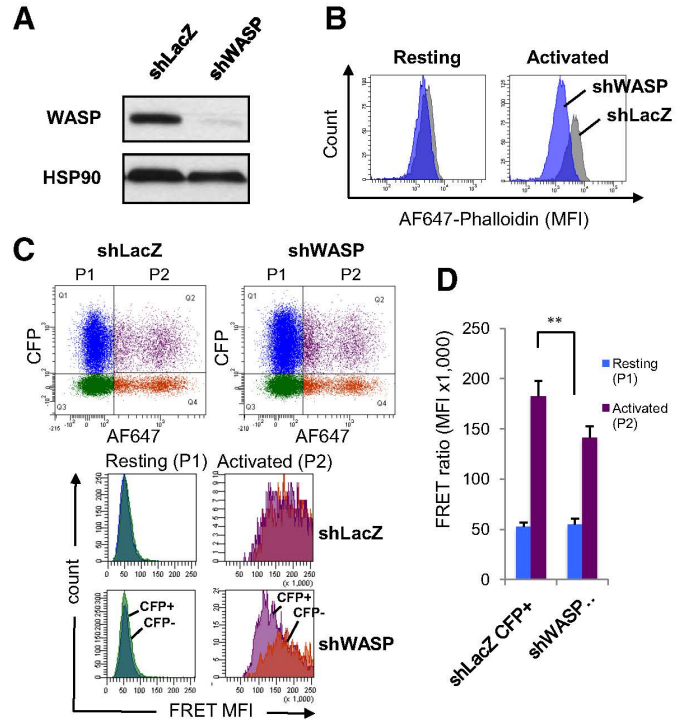


Figure 6. WASP knockdown in FRET-ACT cells decreases actin-FRET signals. (A) FRET-ACT Jurkat cells were transduced with lentiviral constructs encoding the FP CFP and shRNAs targeting LacZ and WASP mRNAs (shLacZ and shWASP). CFP+ cells were lysed and analyzed by immunoblotting with antibodies against WASP or HSP90 as a protein-loading control. (B) Flow cytometric analysis of phalloidin staining on shLacZ and shWASP FRET-ACT cells. Cells were treated or not with anti-CD3/CD28 antibodies for 5 min at 37°C and labeled with Alexa Fluor 647 phalloidin. A representative histogram of fluorescent phalloidin MFI is shown. Data are representative of three experiments. (C) Flow cytometric analysis of actin-FRET signals collected on FRET-ACT cells transduced with shLacZ and shWASP lentiviral particles and activated with anti-CD3/CD28-coated beads, as described in Fig. 5. Actin-FRET signals were determined in unconjugated cells (P1 gate, resting cells) and in conjugated cells (P2 gate, activated cells) on the CFP- or CFP+ population. Representative histograms of the actin-FRET MFI recording are shown. (D) Statistical analysis of the variations of the actin-FRET ratio in activated shWASP cells. Actin-FRET signals were recorded in resting and activated CFP+ shLacZ and CFP+ shWASP and expressed as FRET ratio MFI. Data represent the mean \pm SD of four determinations (** $P < 0.005$).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from INSERM and the Ministère de l’Éducation Nationale et de la Recherche (to N.D. and E.G.). We thank Didier Trono for the lentiviral vector pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE and packaging vectors pMD2.G and pCMVR8; Anne Galy for the shWASP construct; Damien Alcor (INSERM U1065/C3M) for assistance with the confocal microscope; and Julie Cazareth (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) for assistance with the Fortessa analysis. This study is dedicated to the memory of Professor Alain Bernard.

DISCLOSURES

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., Wabnitz, G. H. (2003) Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 30–48.
- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., Dustin, M. L. (2001) The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 375–396.
- Piragyte, I., Jun, C. D. (2012) Actin engine in immunological synapse. *Immune Netw.* **12**, 71–83.
- Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 110–122.
- Deckert, M., Moon, C., Le Bras, S. (2005) The immunological synapse and Rho GTPases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **291**, 61–90.
- Burkhardt, J. K., Carrizosa, E., Shaffer, M. H. (2008) The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 233–259.
- Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I., Sakai, H. (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5262–5266.
- Wang, Y. L., Taylor, D. L. (1981) Probing the dynamic equilibrium of actin polymerization by fluorescence energy transfer. *Cell* **27**, 429–436.
- O'Donoghue, S. I., Hambly, B. D., dos Remedios, C. G. (1992) Models of the actin monomer and filament from fluorescence resonance-energy transfer. *Eur. J. Biochem.* **205**, 591–601.
- Okamoto, K., Hayashi, Y. (2006) Visualization of F-actin and G-actin equilibrium using fluorescence resonance energy transfer (FRET) in cultured cells and neurons in slices. *Nat. Protoc.* **1**, 911–919.
- Swedlow, J. R. (2012) Innovation in biological microscopy: current status and future directions. *Bioessays* **34**, 333–340.
- Chan, F. K. (2004) Monitoring molecular interactions in living cells using flow cytometric analysis of fluorescence resonance energy transfer. *Methods Mol. Biol.* **261**, 371–382.
- He, L., Olson, D. P., Wu, X., Karpova, T. S., McNally, J. G., Lipsky, P. E. (2003) A flow cytometric method to detect protein-protein interaction in living cells by directly visualizing donor fluorophore quenching during CFP → YFP fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Cytometry A* **55**, 71–85.
- Van Wageningen, S., Pennings, A. H., van der Reijden, B. A., Boezeman, J. B., de Lange, F., Jansen, J. H. (2006) Isolation of FRET-positive cells using single 408-nm laser flow cytometry. *Cytometry A* **69**, 291–298.
- Vereb, G., Nagy, P., Szollosi, J. (2011) Flow cytometric FRET analysis of protein interaction. *Methods Mol. Biol.* **699**, 371–392.
- Chapman, S., Oparka, K. J., Roberts, A. G. (2005) New tools for in vivo fluorescence tagging. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 565–573.
- Raarup, M. K., Fjorback, A. W., Jensen, S. M., Muller, H. K., Kjaergaard, M. M., Poulsen, H., Wiborg, O., Nyengaard, J. R. (2009) Enhanced yellow fluorescent protein photoconversion to a cyan fluorescent protein-like species is sensitive to thermal and diffusion conditions. *J. Biomed. Opt.* **14**, 034039.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., Tsien, R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572.
- Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B., Piston, D. W. (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* **22**, 445–449.
- GuezGuez, A., Prod'homme, V., Mouska, X., Baudot, A., Blin-Wakkach, C., Rottapel, R., Deckert, M. (2010) 3BP2 Adapter protein is required for receptor activator of NFκB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 20952–20963.
- Jeanson-Leh, L., Blondeau, J., Galy, A. (2007) Optimization of short hairpin RNA for lentiviral-mediated RNAi against WAS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 498–503.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., Trono, D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267.
- Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L., Korn, E. D. (1994) Jaspakolinide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14869–14871.
- Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., Fosen, K. M. (2000) Effects of Jaspakolinide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* **275**, 5163–5170.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., Elson, E. L. (2001) Effects of cytochalasin D and Latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* **114**, 1025–1036.
- Cao, L. G., Fishkind, D. J., Wang, Y. L. (1993) Localization and dynamics of nonfilamentous actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* **123**, 173–181.
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S., Lappalainen, P. (2004) Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **14**, 386–394.
- Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D., Higgs, H. N. (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 76–82.
- Thrasher, A. J., Burns, S. O. (2010) WASP: a key immunological multitasker. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 182–192.
- Haddad, E., Zugaza, J. L., Louache, F., Debili, N., Crouin, C., Schwarz, K., Fischer, A., Vainchenker, W., Bertoglio, J. (2001) The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* **97**, 33–38.
- Cotta-de-Almeida, V., Westerberg, L., Maillard, M. H., Onaldi, D., Wachtel, H., Meelu, P., Chung, U. I., Xavier, R., Alt, F. W., Snapper, S. B. (2007) Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 15424–15429.
- Lam, A. J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J. D., Cranfill, P. J., Baird, M. A., McKeown, M. R., Wiedenmann, J., Davidson, M. W., Schnitzer, M. J., Tsien, R. Y., Lin, M. Z. (2012) Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* **9**, 1005–1012.

KEY WORDS:

FRET · Flow cytometry · actin · fluorescent protein

Résumé

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) sont de plus en plus fréquents et représentent aujourd'hui le cinquième groupe de cancer au monde. Leur incidence est en constante augmentation. De fait, les LNH constituent un véritable problème de santé publique. Ils regroupent un panel hétérogène de pathologies originaires de cellules lymphatiques. Parmi les LNH à cellules B matures, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) constitue la forme de leucémie de l'adulte la plus fréquente en occident. Les thérapies actuelles, basées sur une combinaison d'agents chimiothérapeutiques et d'anticorps monoclonaux, permettent de ralentir la progression des LNH et d'augmenter l'espérance de vie, mais ne permettent que rarement une guérison du patient.

La physiopathologie des LNH à cellules B matures est marquée par d'importants signaux de survie provenant du microenvironnement et du récepteur des cellules B (BCR). La signalisation provenant de ces voies va entraîner de nombreux processus oncogéniques. Parmi ceux-ci, l'inhibition des mécanismes de la mort cellulaire, notamment via la surexpression de protéines de la famille BCL-2 telles que MCL-1, joue un rôle capital dans les LNH. Mieux comprendre ces mécanismes est ainsi nécessaire pour mieux appréhender ces pathologies et élaborer de nouveaux traitements.

La protéine anti-apoptotique MCL-1 joue un rôle clé dans la survie des LNH à cellules B matures. Sa demi-vie très courte fait de cette protéine une cible finement régulée par le système ubiquitine-protéasome. Parmi les mécanismes pouvant conduire à la dégradation de MCL-1, son ubiquitination a été mise en exergue dans plusieurs travaux récents. Une première partie de ce travail de thèse a été de déterminer quelles pouvaient être les enzymes de déubiquitination (DUBs) impliquées dans la survie des LNH à cellules B matures et la stabilisation de MCL-1. Le recours à de nouveaux agents pharmacologiques inhibiteurs des DUBs ont montré des propriétés cytotoxiques intéressantes sur des LNH. Notre étude a permis d'identifier un panel de DUBs potentiellement impliquées dans la résistance à l'apoptose et la régulation de MCL-1. Parmi celles-ci, la DUB USP14 qui est liée au système ubiquitine-protéasome, montre des résultats favorables dans la régulation de MCL-1 et la survie cellulaire. Nos travaux montrent également pour la première fois que l'activité DUB des cellules, ainsi que l'activité d'USP14, sont directement régulées par la signalisation du BCR via l'activité de la tyrosine kinase SYK. Ces travaux originaux mettent en avant l'importance d'USP14 dans ces voies de signalisation et la mort cellulaire.

Une autre voie d'approche dans les traitements des LNH à cellules B matures cherche à outrepasser la résistance à la mort cellulaire et à la déclencher pour permettre l'élimination des cellules cancéreuses. A ce titre, l'altération de la voie des sphingolipides peut se traduire par la mort cellulaire. Ainsi, dans des études récentes, le FTY720, un analogue de la sphingosine utilisé comme immunosuppresseur dans la sclérose en plaques, a montré un effet cytotoxique dans des hémopathies malignes sans toutefois que son mécanisme d'action soit clairement expliqué. Une deuxième partie de ce travail de thèse a été de caractériser la mort induite par le FTY720. Employé dans la LLC, il montre un effet cytotoxique dose-dépendant. La mort induite par son utilisation présente l'expression de marqueurs de l'apoptose, mais nos résultats indiquent que cette mort est en fait indépendante des caspases. Il s'avère en être de même pour les marqueurs et les mécanismes de la mort autophagique. Notre étude montre que la caractérisation de la morphologie cellulaire et des marqueurs induit par la mort due au FTY720 correspond en fait à une nécrose cellulaire programmée indépendante de RIPK1, mais dépendante d'une enzyme régulatrice de la fission mitochondriale, DRP1.

L'ensemble des travaux de cette thèse permettent d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes et les protéines impliquées dans la mort cellulaire. Ils montrent ainsi l'importance des enzymes de déubiquitination et des sphingolipides dans la régulation de la survie des LNH à cellules B matures. De plus, ils mettent en avant l'intérêt de la DUB USP14 comme nouvelle cible thérapeutique potentielle ainsi que l'utilisation du FTY720 comme alternative thérapeutique dans les néoplasies B résistantes aux chimiothérapies usuelles.

Mots-clés : Lymphome non hodgkinien, USP14, BCR, MCL-1, DUB, Protéasome, Apoptose, FTY720, DRP1, Nécrose